

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**



**FACULTADE DE VETERINARIA**

**LUGO**

**“ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE  
FLUJO Y ENZIMOINMUNOENSAYO DE LA  
RESPUESTA INMUNE EN GANADO  
VACUNO INFESTADO POR *Hypoderma*  
(Diptera: Oestridae)”**

**Memoria presentada por el Licenciado en  
Veterinaria D. Luis Vázquez Sande para  
optar al Título de Doctor.**

*Lugo, julio de 2010*



D. PABLO DÍEZ BAÑOS, Catedrático del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

DÑA. MARIA PATROCINIO MORRONDO PELAYO, Catedrática del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

D. CEFERINO M. LÓPEZ SÁNDEZ, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

DÑA ROSARIO PANADERO FONTÁN, Profesora Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “**ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO Y ENZIMOINMUNOENSAYO DE LA RESPUESTA INMUNE EN GANADO VACUNO INFESTADO POR *Hypoderma* (Diptera: Oestridae)**”, que presenta el licenciado en Veterinaria D. LUIS VÁZQUEZ SANDE para optar al Título de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión, reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 19 de julio de 2010.

Pablo Díez Baños

Maria Patrocinio Morrondo Pelayo

Ceferino M. López Sánchez

Rosario Panadero Fontán

Una parte de los resultados obtenidos en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos de investigación:

1. Evaluation of an antigen capture ELISA for the early diagnosis of *Hypoderma lineatum* in cattle under field conditions. ***Veterinary Parasitology***, 147 (2007): 297-302
2. Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. ***Medical and Veterinary Entomology***, 21 (2007): 225-230.
3. Immunomodulatory effect of *Hypoderma lineatum* antigens: *in vitro* effect on bovine lymphocyte proliferation and cytokine production. ***Parasite Immunology***, 31 (2009): 72-77.
4. Local and systemic cytokine responses during larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). ***Veterinary Immunology and Immunopathology***, 131 (2009): 59-64.

### **Financiación:**

Este trabajo se ha realizado gracias a una **Beca del Programa María Barbeito** concedida por la Xunta de Galicia (29/12/2006-30/09/2007) y a una **Beca del Programa Nacional de Formación de profesorado Universitario (FPU)** concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (01/10/2007-30/12/2010) a D. Luis Vázquez Sande, además del soporte económico de los proyectos de investigación:

**Hipodermosis bovina: respuesta inmunitaria celular y citoquinas como factores determinantes de protección.** (AGL-2004-01827). Ministerio de Educación y Ciencia (2004-2007). Investigador principal: Pablo Díez Baños.

**Ayuda/Incentivo para el proyecto “Hipodermosis bovina: respuesta inmunitaria celular y citoquinas como factores determinantes de protección”.** (Incentivo PGIDIT05PXIC26101PN). Dirección Xeral de I+D. Xunta de Galicia (2005-2008). Investigador responsable: Pablo Díez Baños.

**Patrones de producción de citoquinas y su efecto inmunomodulador en la hipodermosis bovina.** (AGL-2009-08939). Ministerio de Educación y Ciencia (2010-2012). Investigador principal: Rosario Panadero Fontán.

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta, han contribuido a la realización de la presente Tesis Doctoral y en especial:

A mis directores, que han sido mucho más que eso, apoyándome en todo lo que he necesitado, Prof. Dr. Pablo Díez Baños por aportarme todos sus conocimientos y experiencia siempre que lo he necesitado, Profa. Dra. Patrocinio Morrondo Pelayo por estar siempre pendiente de la elaboración de esta memoria, Profa. Dra. Rosario Panadero Fontán por haberme dado la posibilidad de introducirme en el mundo de la investigación y al Prof. Dr. Ceferino López Sáñez por su constancia, dedicación y sus conocimientos estadísticos.

A la Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade Fernández, al Prof. Dr. Adolfo Paz Silva y al Dr. José Luis Suárez por su ayuda, compañerismo y por los buenos momentos que hemos pasado.

Al Doctor Vicente Dacal Rivas, por ser un buen amigo y colaborar en la realización de esta Tesis, trabajar con él es una maravilla. Sin su alegría, ilusión y consejos todos estos años se hubieran hecho mucho más largos.

A la Dra. Marisol Arias por su buen humor y por los buenos momentos y anécdotas dentro y fuera del Departamento.

Al Ayudante Doctor Pablo Díaz por sus consejos, y ratos compartidos en el despacho durante todos estos años.

A mi compañero Javier Pato por tantos días de filtrado y procesado de muestras de animales silvestres, por los buenos momentos y por su ayuda, que no ha sido poca. Igualmente a Sandrita por su forma de ver la vida y por sus múltiples consejos, además, porque su ilusión y alegría animaban las largas horas de trabajo en el laboratorio.

A los demás compañeros del Departamento: Dr. Iván, Ana, Cristiana, Javier Cortiñas, Rubén, Noelia Mourazos, Noelia Lago, Sara y Alberto. A todos gracias por su simpatía, ayuda y por favorecer la creación de un ambiente tan agradable.

A toda la gente que pasó por el departamento: Dra. Carmen Lomba, Estefa, Manolo y a los integrantes de la Clínica Aceña de Olga (Dr. Ángel Romasanta, Adriana y Patricia) por sus enseñanzas en patología canina, y en particular a María “Komenencias” por nuestros inicios comunes en la investigación de la parasitología de los corzos.

A Elena, por la parte administrativa necesaria para que esta Tesis Doctoral saliera a la luz y que siempre se preocupó por su realización.

A mis amigos de Veterinaria, en especial a Marcos, Jorge y Benito por los buenos momentos y anécdotas compartidas durante todos estos años.

A mis compañeros de caza de Mosteiro, Fonsagrada y Terra Chá, especialmente a Antón, David, Paderne, Marcos, Constante, Juan, Arturo, Hilario, Pancho, Toñito, Chicho... son tantos que es imposible mencionarlos a todos, por las innumerables horas y buenos momentos compartidos todos estos años.

Al personal del matadero NOVAFRIGSA por facilitarme la recogida de esófagos para la realización de esta Tesis. Asimismo, a Pepe de Millares por poner a nuestra disposición todos los animales de su explotación para todo aquello que necesitáramos. De la misma forma, a la buena gente que he conocido durante la recogida de muestras de corzos para mi “otra Tesis” y que han facilitado tanto esa difícil fase del estudio.

A mi familia, por su apoyo perseverante, por la paciencia que han tenido en el transcurso de mi Licenciatura en Veterinaria y en la realización de este trabajo ya que sin sus ánimos esta Tesis no hubiera sido posible.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

---

**ACD:** ácido cítrico dextrosa

**AcMo:** anticuerpo monoclonal

**ANOVA:** análisis de varianza

**APC:** célula presentadora de antígeno (*antigen presenting cell*)

**BoT2:** antígeno de la especie bovina homólogo del CD2 humano

**BoT4:** antígeno de la especie bovina homólogo del CD4 humano

**BoT8:** antígeno de la especie bovina homólogo del CD8 humano

**BrdU:** 5-bromo-2'-desoxiuridina

**BSA:** seroalbúmina bovina

**CD:** grupo de diferenciación (*cluster of differentiation*)

**CMH I:** complejo mayor de histocompatibilidad tipo I

**CMH II:** complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

**CMSP:** células mononucleares de sangre periférica

**Con A:** concanavalina A

**DEAE:** dietilaminoetil

**DO:** densidad óptica

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** enzimoimmunoensayo (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

**E-S:** excreción-secreción

**ET:** extracto total

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**FS/FSC:** luz dispersada hacia delante (*forward scatter*)

**G:** gravedad

**GM-CSF:** factor estimulador de granulocitos y macrófagos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)

**GST:** glutation S-transferasa

**h.p.i.:** horas post-infestación

**HAP:** hemoaglutinación pasiva

**HLA:** antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*)

**HPLC:** cromatografía líquida de alto rendimiento (*high performance liquid chromatography*)

**HRP:** peroxidasa obtenida del rábano picante (*horseradish peroxidase*)

**HyA:** hipodermina A

**HyB:** hipodermina B

**HyC:** hipodermina C

**IEF:** inmunoelectroforesis

**IFI:** inmunofluorescencia indirecta

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**IgE:** inmunoglobulina E

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgG1:** inmunoglobulina G subclase 1

**IgG2:** inmunoglobulina G subclase 2

**IgM:** inmunoglobulina M

**IL:** interleuquina

**kDa:** kilodalton

**L-1:** larvas de primer estadio

**L-2:** larvas de segundo estadio

**L-3:** larvas de tercer estadio

**m.p.i.:** meses post-infestación

**MIF:** factor inhibidor de macrófagos (*macrophage inhibitory factor*)

**MPL:** monofosforil-lípido A (*monophosphoril-lipid A*)

**ng ml<sup>-1</sup>:** nanogramos por mililitro

**NK:** células asesinas naturales (*natural killer cells*)

**nm:** nanómetro



**NO:** óxido nítrico

**OPD:** ortofenildiamina

**p.t.:** post-tratamiento

**p.v.:** peso vivo

**PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

**PBS:** fostato buffer salino

**PerCP:** ficobiliproteína aislada de algas rojas (*phycobiliprotein isolated from red algae*)

**PETG:** copoliéster de polietilentereftalato glycol (*polyethylene terephthalate glycol*)

**pg ml<sup>-1</sup>:** picogramos por mililitro

**PGE<sub>2</sub>:** prostaglandina E<sub>2</sub>

**PT:** fostato buffer salino con Tween 20

**PTL:** fostato buffer salino con Tween 20 y leche en polvo

**PWM:** mitógeno de hierba carmín (*pokeweed mitogen*)

**r.p.m.:** revoluciones por minuto

**RAB:** anticuerpo de conejo frente a anticuerpos de bovino (*rabbit anti-bovine*)

**RPMI:** medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (*Roswell Park Memorial Institute medium*)

**s.p.i.:** semanas post-infestación

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SFB:** suero fetal bovino

**ShAB:** anticuerpo de oveja frente a anticuerpos de bovino (*sheep anti-bovine*)

**SS/SSC:** luz dispersada en ángulo recto (*side scatter*)

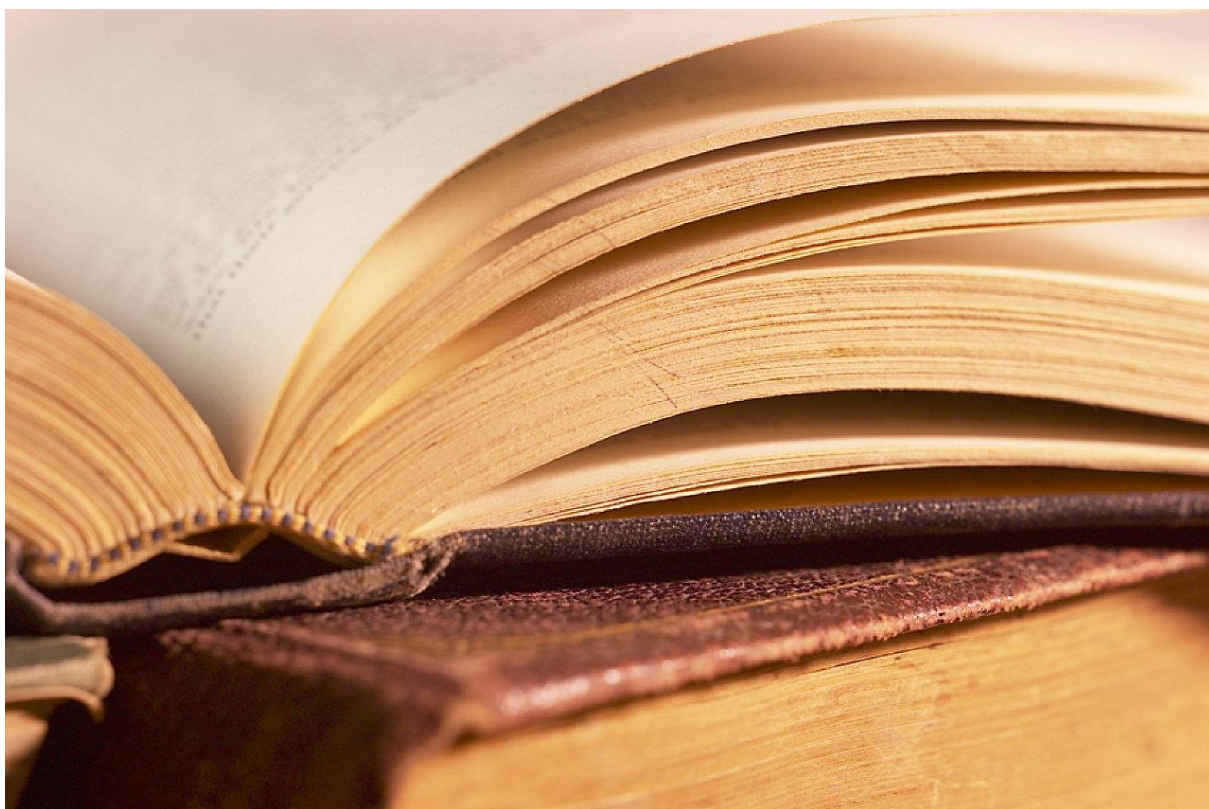
**Th0:** células T colaboradoras tipo 0 (*T helper cells 0 type*)

**Th1:** células T colaboradoras tipo 1 (*T helper cells 1 type*)

**Th2:** células T colaboradoras tipo 2 (*T helper cells 2 type*)

**TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa

**Tris-HCl:** tris (hidroximetil)aminometano clorhídrico



# **ÍNDICE**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2.1.- HIPODERMOSIS .....</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1.1.- AGENTE ETIOLÓGICO.....  | 9         |
| 2.1.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS DISTINTOS ESTADIOS DE<br>DESARROLLO DE <i>H. bovis</i> E <i>H. lineatum</i> ..... | 9         |
| 2.1.2.- CICLO BIOLÓGICO.....  | 14        |
| 2.1.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE <i>Hypoderma</i> spp. ....                                  | 19        |
| 2.1.3.1.- FACTORES EXTRÍNSECOS O MEDIOAMBIENTALES .....   | 19        |
| 2.1.3.2.- FACTORES INTRÍNSECOS O DEPENDIENTES DEL<br>HOSPEDADOR .....   | 24        |
| 2.1.4.- PATOGENIA.....  | 25        |
| 2.1.5.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....  | 33        |
| 2.1.6.- LESIONES.....   | 35        |
| 2.1.7.- DIAGNÓSTICO.....  | 40        |
| 2.1.7.1- DIRECTO .....  | 40        |
| 2.1.7.2.- INMUNOLÓGICO .....  | 41        |
| 2.1.8.- RESPUESTA INMUNE EN LA INFESTACIÓN POR <i>Hypoderma</i> spp. ....                                     | 47        |
| 2.1.8.1.- RESPUESTA INNATA.....   | 47        |
| 2.1.8.2.- RESPUESTA ADQUIRIDA .....   | 48        |
| 2.1.8.2.1.- Respuesta celular .....   | 49        |
| 2.1.8.2.2.- Respuesta humoral.....  | 58        |
| <b>2.2.- LAS CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS<br/>INFECCIONES PARASITARIAS .....</b>               | <b>64</b> |
| <b>2.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO LAMINAR .....</b>  | <b>73</b> |
| 2.3.1.- FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....  | 73        |
| 2.3.2.- APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LA<br>RESPUESTA INMUNE CELULAR .....          | 77        |
| 2.3.2.1.- DETERMINACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS<br>EN GANADO VACUNO .....                         | 81        |

### **3.- CAPÍTULO 1: RESPUESTAS CELULAR Y HUMORAL DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DEL CICLO DE *Hypoderma lineatum*..... 87**

#### **3.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 89**

#### **3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS..... 93**

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1.- ANIMALES EXAMINADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MUESTREOS .....                                       | 95  |
| 3.2.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO .....   | 96  |
| 3.2.2.1.- Esófagos.....   | 96  |
| 3.2.2.2.- Sangre .....  | 98  |
| 3.2.2.3.- Ganglios linfáticos .....   | 98  |
| 3.2.3.- PROTOCOLO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DIRECTA EN SANGRE PERIFÉRICA.....                           | 99  |
| 3.2.4.- PROTOCOLO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DIRECTA EN LINFOCITOS AISLADOS DE GANGLIOS LINFÁTICOS ..... | 101 |
| 3.2.5.- PROTOCOLO DEL ELISA SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN DE HIPODERMINA C CIRCULANTE .....                | 103 |
| 3.2.6.- PROTOCOLO DEL ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS G.....                  | 105 |
| 3.2.7.- PROTOCOLO DEL ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN LAS IgG1, IgG2 E IgM .....                      | 107 |
| 3.2.8.- NORMALIZACIÓN DE LAS ABSORBANCIAS .....   | 108 |
| 3.2.9.- DETERMINACIÓN DE LOS VALORES HEMATOLÓGICOS .....  | 109 |
| 3.2.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....  | 109 |

#### **3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 111**

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.1.- DETECCIÓN DEL ANTÍGENO HIPODERMINA C Y DE LOS ANTICUERPOS CIRCULANTES DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE <i>H. lineatum</i> ..... | 113 |
| 3.3.1.1.- Hipodermina C.....  | 113 |
| 3.3.1.2.- Detección de anticuerpos circulantes mediante ELISA indirecto.....  | 115 |
| Inmunoglobulinas G totales.....   | 115 |
| Inmunoglobulinas G, subclase 1 .....  | 116 |
| Inmunoglobulinas G, subclase 2 .....  | 117 |
| Inmunoglobulinas M .....  | 119 |
| 3.3.2.- ANALISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE <i>H. lineatum</i> .....                      | 120 |
| 3.3.2.1.- Recuento de eritrocitos .....   | 120 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.3.2.2.- Recuento de leucocitos .....   | 122 |
| 3.3.2.3.- Determinación de las distintas poblaciones leucocitarias .....   | 123 |
| <i>Linfocitos</i> .....  | 123 |
| <i>Monocitos</i> .....   | 125 |
| <i>Granulocitos</i> .....  | 126 |
| 3.3.3.- DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD2, CD4 y CD8 EN LINFOCITOS CIRCULANTES DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE <i>H. lineatum</i> ..... | 129 |
| 3.3.3.1.- Linfocitos T (CD2 <sup>+</sup> ) .....   | 129 |
| 3.3.3.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4 <sup>+</sup> ) .....   | 130 |
| 3.3.3.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ) .....   | 131 |
| 3.3.3.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8.....   | 132 |
| 3.3.4.- DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS MARCADORES DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS OBTENIDOS DE GANGLIOS LINFÁTICOS .....                                 | 134 |
| 3.3.4.1.- Linfocitos T (CD2 <sup>+</sup> ) .....   | 134 |
| 3.3.4.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4 <sup>+</sup> ) .....   | 135 |
| 3.3.4.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ) .....   | 136 |
| 3.3.4.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8.....   | 137 |

#### **4.- CAPÍTULO 2: RESPUESTA CELULAR Y HUMORAL EN GANADO VACUNO INFESTADO DE FORMA NATURAL POR *Hypoderma* spp. ....139**

##### **4.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....141**

##### **4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....145**

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.1.- ANIMALES EXAMINADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MUESTREOS .....   | 147 |
| 4.2.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO ....  | 151 |
| 4.2.3.- PROTOCOLO DEL ELISA SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN DE IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ E IFN- $\gamma$ ..... | 152 |
| 4.2.3.1.- Normalización de las absorbancias y cálculo de las concentraciones.....                                 | 153 |
| 4.2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....   | 154 |

##### **4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....155**

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.1.- EVOLUCIÓN DEL ANTÍGENO HIPODERMINA C Y DE LOS ANTICUERPOS CIRCULANTES EN EL CURSO DEL CICLO DE <i>Hypoderma</i> ..... | 157 |
| 4.3.1.1.- Hipodermina C.....  | 157 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.1.2.- Inmunoglobulinas G totales .....  | 160 |
| 4.3.1.3.- Inmunoglobulinas G, subclase 1 .....  | 163 |
| 4.3.1.4.- Inmunoglobulinas G, subclase 2 .....  | 165 |
| 4.3.1.5.- Inmunoglobulinas M .....  | 167 |
| 4.3.2.- DETERMINACIÓN DE LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS DURANTE LA INFESTACIÓN POR <i>Hypoderma</i> spp.....                    | 169 |
| 4.3.2.1.- Evolución del número de eritrocitos .....   | 169 |
| 4.3.2.2.- Evolución del número total de leucocitos .....  | 171 |
| 4.3.2.3.- Evolución de las distintas poblaciones leucocitarias en bovinos infestados por <i>Hypoderma</i> spp.....                              | 174 |
| <i>Linfocitos</i> .....   | 174 |
| <i>Monocitos</i> .....  | 176 |
| <i>Granulocitos</i> .....   | 178 |
| 4.3.3.- DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS RECEPTORES DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS CIRCULANTES DURANTE LA INFESTACIÓN POR <i>Hypoderma</i> ..... | 181 |
| 4.3.3.1.- Linfocitos T (CD2 <sup>+</sup> ) .....  | 181 |
| 4.3.3.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4 <sup>+</sup> ) .....  | 183 |
| 4.3.3.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8 <sup>+</sup> ) .....  | 185 |
| 4.3.3.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8.....  | 187 |
| 4.3.4.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE DIFERENTES CITOQUINAS EN ANIMALES INFESTADOS NATURALMENTE POR <i>Hypoderma</i> spp. ....        | 190 |
| 4.3.4.1.- Factor de necrosis tumoral alfa .....   | 190 |
| 4.3.4.2.- Interferón gamma .....  | 193 |
| 4.3.4.3.- Interleuquina 12.....   | 197 |
| 4.3.4.4.- Interleuquina 10.....   | 199 |
| 4.3.4.5.- Interleuquina 4.....  | 203 |

## **5.- CAPÍTULO 3: EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS PRINCIPALES FRACCIONES ANTIGÉNICAS DE LARVAS 1 DE *Hypoderma lineatum*.....207**

### **5.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....209**

### **5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....213**

#### **5.2.1.- ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS..... 215**

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.2.- ANTÍGENOS Y MITÓGENOS .....   | 216        |
| 5.2.2.1.- Obtención y purificación de las distintas fracciones antigénicas .....                                | 216        |
| 5.2.2.2.- Mitógenos .....   | 217        |
| 5.2.3.- AISLAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES.....   | 218        |
| 5.2.4.- TEST DE LINFOPROLIFERACIÓN .....  | 219        |
| 5.2.5.- EFECTO DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN<br>DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES CELULARES.....  | 221        |
| 5.2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....   | 221        |
| <br><b>5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>223</b> |
| 5.3.1.- ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN CELULAR .....  | 225        |
| 5.3.2.- EFECTO DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN<br>DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES CELULARES ..... | 229        |
| 5.3.2.1.- Interferón gamma .....  | 229        |
| 5.3.2.2.- Interleuquina 4.....  | 231        |
| 5.3.2.3.- Interleuquina 10.....   | 232        |
| <br><b>6.- CONCLUSIONES .....</b>   | <b>235</b> |
| <br><b>7.- RESUMEN .....</b>  | <b>239</b> |
| <br><b>8.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>245</b> |







# **1.- INTRODUCCIÓN**



Las larvas de primer estadio de *Hypoderma* spp. penetran por la piel y migran a través del tejido conjuntivo con ayuda de las secreciones enzimáticas de sus glándulas salivales que se almacenan en su intestino medio (Boulard, 1969). La digestión tisular se produce extracorporeamente por la acción de las sustancias regurgitadas, de modo que los tejidos degradados y los exudados serosos son ingeridos por las larvas. Mediante el estudio de las secreciones de las L-1 ya hace algún tiempo que se han descrito y caracterizado tres serin-proteasas denominadas hipodermina A, B y C (Boulard y Garone, 1968; Lecroisey y col. 1983). Existen evidencias de que las secreciones larvarias están implicadas en un proceso inmunomodulador que afecta tanto a la inflamación como a las respuestas inmunitarias específicas del hospedador y que contribuyen a la supervivencia del parásito durante su prolongada migración (entre 8 y 10 meses) a través del tejido conectivo del hospedador.

La importancia de la hipodermosis en nuestro país, ha quedado reflejada en diversos estudios efectuados en León (Cordero y Fernández, 1962), Asturias (Prieto y col., 1997), Galicia (Morrondo y col., 1999; Panadero y col., 2007), Andalucía (Martínez-Gómez y col., 1988; Martínez-Moreno y col., 1992) y Extremadura (Reina y col., 1994), de modo que, a pesar de disponer de fármacos eficaces, la incidencia de esta parasitosis sigue siendo notable en amplias zonas de nuestro país y de otros europeos, africanos y americanos. La trascendencia económica de esta miasis se ha ignorado durante mucho tiempo, y aunque los síntomas son poco evidentes, su presencia es responsable de pérdidas muy considerables, basadas en la reducción de producción de leche, en menor ganancia de peso, muy acentuada en animales intensamente parasitados, en la depreciación de las canales y deterioro de las pieles, así como las debidas al efecto favorecedor de otras infecciones. A esto hay que añadir su carácter zoonótico, citándose con cierta frecuencia casos de infestaciones humanas.

La patogenia de la hipodermosis guarda relación con la edad y el estado inmunitario de los animales. Se ha comprobado que el ganado vacuno desarrolla cierta resistencia tras repetidas exposiciones a las larvas de *Hypoderma* spp., como lo demuestra el hecho refrendado de que los animales más jóvenes presenten, por lo general, un número de nódulos larvarios significativamente superior respecto de los de más edad. Así, en animales primoinfestados, apenas existen lesiones en el tejido conjuntivo que rodea a las larvas, mientras que, en las reinfestaciones, las larvas 1 aparecen rodeadas por áreas edematosas y con abundantes infiltrados, compuestos principalmente por eosinófilos y linfocitos; sin embargo, a pesar de esta intensa reacción, las L-1 vivas nunca aparecen encapsuladas,

mientras que, por el contrario, las L-1 muertas se encuentran en el interior de pequeños nódulos con la estructura de un granuloma. Las larvas 2 y 3 no migran y se encuentran en el interior de granulomas subcutáneos. Esta resistencia constituye un factor importante en el control de las poblaciones del parásito, comprobándose que es dependiente del número de exposiciones previas y del número de larvas que infesten al hospedador.

La respuesta humoral se ha estudiado ampliamente, habiéndose desarrollado técnicas de diagnóstico precoz, encaminadas a detectar anticuerpos y/o antígenos parasitarios (Boulard y Weintraub, 1973; Boulard y Bencharif, 1984; Panadero y col., 2001; Colwell y col., 2003). No obstante, es manifiesta la ausencia de relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia alcanzado por los animales (Pruett y Barrett, 1985; Panadero, 1996), por lo que, se sospecha que la respuesta celular que ha sido menos investigada hasta el momento, juegue también un papel muy importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis. Nelson y Weintraub (1972) denunciaron evidencias de que la respuesta celular estaba implicada en la inmunidad frente a *Hypoderma*, como lo demostraba la fuerte reacción celular producida tras la penetración de las larvas, que se apreciaba en especial en animales reinfestados. Tras esta primera aproximación, Baron y Weintraub (1986) estudiaron la respuesta linfoproliferativa en animales primo y reinfestados recurriendo a la activación con distintos mitógenos. Estos autores sugieren que la resistencia adquirida frente a la hipodermosis presenta una base celular y que en ella participan células T y B.

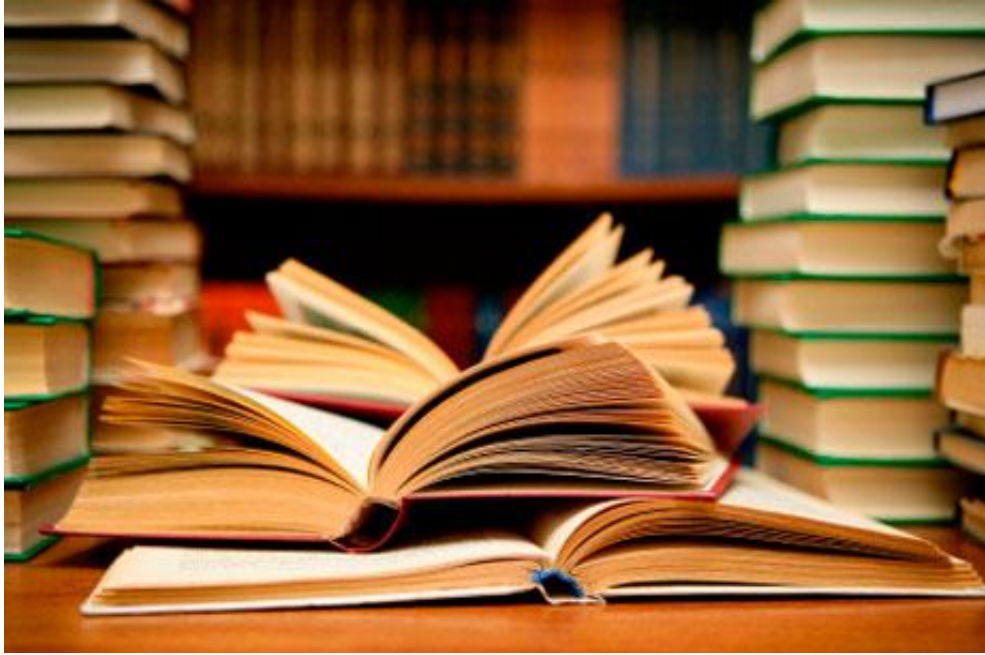
El papel de las citoquinas en la regulación y modulación de la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado desde la postulación del paradigma Th1/Th2. Este paradigma propone que, tras un primer contacto con un antígeno, se produce una polarización de las células T colaboradoras hacia dos respuestas distintas (Th1 y Th2) que pueden distinguirse por la expresión de determinadas citoquinas (Mosmann y Coffman, 1989). Sin embargo, aunque la realidad es mucho más compleja que una simple polarización dicotómica, este paradigma todavía resulta útil para comprender la respuesta inmune adaptativa. Así, el IFN- $\gamma$  y la IL-12 son consideradas citoquinas claves en la respuesta Th1 y sirven de indicadores de una predominancia de las respuestas mediadas por células, mientras que la IL-4 participa en la polarización Th2 y su secreción sugiere un predominio de las respuestas humorales. Con respecto a la IL-10 se estima que puede ser un elemento que participe en ambos tipos de respuesta inmune presentando un efecto regulador (McGuirk y Mills, 2002).

Actualmente la lucha frente a la hipodermosis bovina se centra únicamente en la administración de fármacos, cuyo uso plantea algunos problemas, tanto para los animales (toxicidad, dosificación y periodos de aplicación, etc.), como para la salud humana (presencia de residuos en leche y carne), e incluso de concentración en el medio. Por otra parte, la falta de eficacia de las vacunas probadas, basadas en distintas fracciones antigénicas del parásito, sugiere la participación de otras moléculas y de mecanismos más complejos en el desarrollo de protección por parte del hospedador. De ahí, que la búsqueda de nuevas estrategias de lucha vaya orientada a reforzar mecanismos naturales de defensa del hospedador. Actualmente hay poca información disponible sobre el tipo de respuesta inmunitaria que pueda ser responsable directa de inmunidad protectora frente a *Hypoderma* en ganado vacuno. Por este motivo, es necesario un conocimiento más profundo de las respuestas del hospedador frente esta miasis, lo que permitirá en el futuro llegar a nuevas estrategias, basadas en tratamientos moduladores encaminados a limitar el desarrollo y la presencia de larvas.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, planteamos un estudio encaminado a conseguir los siguientes **OBJETIVOS GENERALES**:

- 1.- Estudiar la respuesta inmune celular y humoral a lo largo de las distintas fases del ciclo de *Hypoderma* spp. en ganado vacuno infestado naturalmente.
- 2.- Establecer diferencias entre animales primoinfestados y reinfestados como base para esclarecer los mecanismos de resistencia frente a este parásito.
- 3.- Determinar el patrón de producción de distintas citoquinas implicadas en el inicio de las respuestas inflamatoria e inmunitaria frente a las larvas de *Hypoderma*.
- 4.- Analizar el efecto inmunomodulador de las distintas fracciones antigénicas obtenidas de las larvas 1 del parásito.





## **2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





## 2.1.- HIPODERMOSIS

### 2.1.1.- AGENTE ETIOLÓGICO

La hipodermosis es una miasis producida por dípteros de la familia Oestridae, cuyas larvas ejercen un acusado impacto sobre la productividad y bienestar de los animales infestados.

De las seis especies incluidas tradicionalmente en el género *Hypoderma* (Zumpt, 1965) sólo dos parasitan de forma obligatoria al ganado vacuno, *Hypoderma bovis* (Linnaeus, 1758) e *Hypoderma lineatum* (de Villiers, 1789), denominadas respectivamente mosca “grande y pequeña” de los bóvidos. Recientemente, y tras intensos debates y discusiones dentro de la comunidad científica (Otranto y col., 2004, 2005; Otranto y Colwell, 2005), ha sido aceptada como especie válida, *Hypoderma sinense*, que había sido considerada mucho tiempo como sinónimo de *H. lineatum*. No obstante, la distribución de esta especie está restringida a regiones de China donde afecta preferentemente a yacks y a ganado vacuno.

#### 2.1.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE *H. bovis* E *H. lineatum*

Las **moscas adultas** de *Hypoderma* spp. poseen un revestimiento piloso abundante que aparece estriado en el abdomen formando tres anillos de color; la cabeza es fuerte y más ancha incluso que la parte anterior del tórax, que es esférico; los ojos están bien desarrollados y separados; sus piezas bucales son afuncionales, al estar atrofiadas (Zumpt, 1965). El abdomen es más estrecho que el tórax; en las hembras el último segmento está modificado formando el ovipositor, que sirve para poner los huevos en los pelos de los bovinos.

Los adultos son muy móviles y con desplazamientos rápidos; en estado de reposo, la cabeza está más alta, de modo que su postura respecto del plano horizontal es típicamente inclinada con sus dos alas divergentes.

*H. bovis*, que mide de 12 a 16 mm de longitud, es parecida a un abejorro y su cuerpo está recubierto de abundante pilosidad en cabeza, tórax y abdomen (Gil-Collado, 1961). El primer segmento abdominal es gris con algunos pelos blancos o amarillentos; el segundo es más oscuro y el tercero amarillo oscuro; sus alas son grandes y de color gris, no transparente (Zumpt, 1965). Las patas son lisas y de escasa pilosidad.

*H. lineatum* es denominada también "mosca de la pezuña o de las cuartillas", los machos miden hasta 12 mm y las hembras no sobrepasan los 13 mm (Imagen 1). Los pelos del tórax son blanco-amarillentos y en el abdomen se disponen formando una banda amarilla clara, que alterna con otra más oscura y finaliza con una anaranjada. Sus alas son transparentes y las patas tienen abundante pilosidad oscura y son rugosas.



Imagen 1.- Ejemplar adulto de *H. lineatum*

En ambas especies los **huevos** son de color blanco, sin opérculo y de forma alargada. Se fijan a la base del pelo por un pequeño pedúnculo flexible de sustancia gelatinosa con la que se adhieren firmemente en posición oblicua respecto del pelo (Cogley y col., 1981). Los huevos de *H. bovis* miden 1 mm y se disponen en cada pelo de forma individual, mientras que los de *H. lineatum* se sitúan en el mismo pelo en hileras de 5 a 15 huevos y son algo más pequeños.



**Imagen 2.- Larvas 1 de *H. lineatum* extraídas de la submucosa esofágica de ganado vacuno**

Las larvas recién eclosionadas o **larvas 1** son muy delgadas, fusiformes y con los extremos redondeados (Imagen 2). Son totalmente transparentes, apreciándose bien sus órganos internos; el tubo digestivo está constituido por el esófago o intestino anterior al que se unen dos glándulas salivales; se prolonga con el intestino medio repleto de líquido amorfo ligeramente verdoso que dilata y da turgencia a la larva; el intestino medio se encuentra obstruido caudalmente por una masa celular que lo separa del intestino posterior (Boulard, 1969).

Están divididas en 11 segmentos casi iguales, con espinas de distinto tamaño que se disponen en filas irregulares dirigidas hacia atrás, lo que facilita su desplazamiento por los tejidos del hospedador. La L-1 recién eclosionada, que mide menos de 1 mm, tras su llegada a los campamentos de invierno (submucosa esofágica y canal raquidiano), alcanza 5 mm y al final de su migración sobrepasa los 15 mm (Arru y col., 1985; Panadero y col., 2007). En el extremo anterior posee un “aparato bucal” o esqueleto cefálico, compuesto por un espolón medial y dos ganchos laterales cuya forma es diferente en ambas especies, lo cual permite su identificación. Los ganchos bucales de *H. lineatum* poseen un extremo anterior afilado no dividido y con un diente lateral curvado; por el contrario, los de *H. bovis* están divididos en su extremo anterior y no poseen diente lateral (Weintraub y col., 1968). En el extremo final las L-1 de *Hypoderma* spp. poseen dos placas estigmáticas que constan de dos pares de aberturas espiraculares, cada una rodeada por un anillo con 3 espinas (Colwell, 1989).

Las **larvas 2** más redondeadas y más anchas en su parte central, se estrechan en los extremos anterior y posterior. Alcanzan 10-16 mm de largo y 4-5 mm de diámetro; son de color amarillo-blانquecino y están dotadas de movimientos contráctiles. Presentan espinas cuticulares fuertes que se aprecian mejor en las fases más jóvenes. Su aparato bucal ha

evolucionado y están desprovistas de ganchos bucales. Su aparato respiratorio está bien adaptado a la vida aerobia, con dos placas estigmáticas posteriores de forma circular y con varios anillos estigmáticos. Colwell (1989), mediante microscopía electrónica, puso en evidencia la presencia de 29 a 40 aberturas en las placas respiratorias de las L-2 de *H. bovis*, mientras que las de *H. lineatum* poseen tan solo 18-25.

Las **larvas 3** son más gruesas y con forma de tonel; miden entre 2,5 y 3 cm de largo y 1,4-1,7 cm de diámetro (Borchert, 1964); su cara ventral es convexa y la dorsal ligeramente plana o cóncava (Imagen 3). Su cuerpo está dividido en 11 segmentos, la mayor parte de los cuales lleva en la parte anterior de la cara ventral una línea de espinas gruesas, oscuras y dirigidas hacia atrás y en la parte posterior una banda de pequeñas espinas quitinosas, dirigidas hacia delante. La parte ventral anterior del décimo segmento de las L-3 de *H. bovis* no tiene espinas, mientras que en *H. lineatum* se observan bien (Lapage, 1968). Las espinas están menos desarrolladas en la parte dorsal (Zumt, 1965).



**Imagen 3.- Larvas 3 de *H. lineatum* obtenidas de nódulos larvarios del dorso de ganado vacuno**

El color de las L-3 depende mucho de su momento de desarrollo; al principio son pardo amarillentas, posteriormente se van oscureciendo considerablemente, hasta hacerse marrón oscuro o negruzco poco antes de abandonar el hospedador.

Con microscopía electrónica de barrido se ha estudiado en detalle el patrón de distribución de las espinas cefálicas y torácicas, así como la forma de las placas respiratorias y de la sutura opercular, lo que ha permitido diferenciar con claridad las tres especies que afectan a los bóvidos (*H. lineatum*, *H. bovis* e *H. sinense*) y a los cérvidos (*H. diana*, *H. actaeon* e *H. tarandi*) (Colwell y col., 1998, Colwell, 2001; Otranto y col., 2003, 2004).

Las L-3 de *Hypoderma* spp., al igual que las L-2, son aerobias y respiran a través de unos estigmas u orificios respiratorios localizados en las placas respiratorias del último segmento. La forma de las placas así como la disposición de los orificios respiratorios difiere con las especies. En *H. bovis* las placas respiratorias son redondeadas y se encuentran profundamente incurvadas en su centro con un canal de separación largo y estrecho, cada una de ellas está dividida en 10 septos, que poseen hasta una treintena de orificios respiratorios, rodeados por un pequeño anillo, que normalmente lleva una espina. En *H. lineatum* las placas respiratorias son más planas, el canal de separación más abierto y están divididas en 7 septos, cada uno de los cuales posee menos de 30 estigmas rodeados por un anillo que no lleva espinas (Colwell, 1989).

Scholl y col. (1989) establecieron, en base al color de la cutícula y el desarrollo de los espiráculos respiratorios, tres fases en el desarrollo de las larvas 3 de *Hypoderma* spp. En la fase más temprana (P1), las larvas son aparentemente blancas y sus placas respiratorias posteriores están sin melanizar; al final de esta fase, la cutícula ya es amarilla y, los márgenes de las placas respiratorias comienzan a melanizarse. En la segunda fase (P2) las placas estigmáticas se oscurecen progresivamente, de modo que al comienzo de la última fase (P3) la larva ya posee una cutícula que se oscurece a medida que se acerca su salida para la pupación; sin embargo, las placas respiratorias posteriores están ya completamente desarrolladas y melanizadas.

Para la recogida de las larvas 2 y 3 está totalmente desaconsejada la extracción o deslarvado manual, ya que es probable que al presionar los nódulos presentes en el dorso se produzca la rotura de las larvas y el consiguiente riesgo de choque anafiláctico. Bishopp y col. (1926) y Barret (1981) colocan un dispositivo (bote, bolsa, etc.) sobre los nódulos larvarios que recoge la larva una vez que ésta abandona al hospedador; Minar y Breev (1982) recogen las larvas maduras de *Hypoderma* spp. manteniendo a los bovinos parasitados sobre una rejilla metálica. Scholl y Barrett (1986) idearon un método rápido y eficaz de extracción que consiste en la inyección de 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3% a través del orificio respiratorio. Estas larvas así recogidas, si se extraen con un grado de madurez óptimo y si se lavan inmediatamente con agua, suelen sobrevivir como las que emergen de forma natural.

Las larvas 3 que caen al suelo quedan inmóviles, su cutícula se endurece considerablemente y forman las **pupas** o **puparios**. El color de las pupas es prácticamente

negro, están aplanadas por su parte anterior y tienen un opérculo bien visible por el que saldrá la mosca adulta tars la pupación (Zumpt, 1965).

La pupa mide 2-2,8 cm por 1,4-1,8 cm de grosor, siendo algo menor la de *H. lineatum*, y en ella se ven las protuberancias, a modo de espinas, mejor que en la de *H. bovis*.

### 2.1.2.- CICLO BIOLÓGICO

Los **adultos** de *Hypoderma* spp. completan su metamorfosis en 2-5 semanas y emergen del pupario; para ello levantan el opérculo mediante la vesícula cefálica o *ptilinum*. Esta salida se produce a las pocas horas de la salida del sol, probablemente como una respuesta al incremento de la temperatura. Los adultos tienen las piezas bucales atrofiadas y por ello no se alimentan durante la fase de vuelo (Zumpt, 1965). Su vida es muy corta y depende de las reservas acumuladas a lo largo del desarrollo larvario, cuyo agotamiento se asocia, en gran medida a la temperatura; la mayoría de los autores (Pfadt, 1975; Boulard y col., 1988a y Benakhla y col., 1993) señalan una vida media de 3-4 días y raramente superior a 8 días.

Las hembras de *Hypoderma* realizan un vuelo corto, circular, rápido y especialmente ruidoso, siendo esto último lo que amedrenta especialmente al ganado vacuno, provocando a veces auténticas estampidas.

Los oéstridos poseen en general mucha capacidad voladora, siendo capaces de alcanzar velocidades de 28,8-40 km/h (Nilssen y Anderson, 1995) y de desplazarse en un radio de 5 km y a veces hasta 14 km; no penetran en los establos ni en locales cerrados y siempre “atacan” a los rebaños en los pastos y en espacios abiertos. En este sentido, Benakhla y col. (1993) en Argelia comprobaron que los bovinos que permanecían estabulados durante todo el año apenas se encontraban parasitados, mientras que los que pastaban al aire libre estaban más parasitados, con cifras medias de 17,5 barros por animal.

La cópula se realiza al poco de abandonar la mosca el pupario y tiene lugar generalmente en el suelo, aunque en algunas ocasiones se ha observado en pleno vuelo (Weintraub, 1961).

Según Scholl y Weintraub (1988), las hembras de *Hypoderma* poseen dos adaptaciones muy particulares para compensar su corto periodo de vida. Una de ellas es que el comienzo de la oogénesis ya tiene lugar en las L-3 y en las pupas, y otra es el desarrollo simultáneo de dos oocitos en el mismo ovario, lo cual duplica su capacidad reproductora, de modo que a partir de una sola pareja de moscas se puede infestar, en tan solo dos años, a todos los individuos de un rebaño de 100 bovinos.

Una vez fecundada, la hembra puede depositar entre 500 y 1000 huevos, llegando incluso a disponer hasta 100 huevos sobre un mismo animal. El **comportamiento de la puesta** de los oéstridos se caracteriza porque cada mosca tiende a depositar sus huevos en el mayor número de hospedadores posible con el fin de disminuir la competencia entre su propia progenie y aumentar las posibilidades de que parte de su descendencia complete el ciclo. La hembra de *H. bovis* deposita los huevos durante el vuelo, causando un gran desconcierto por el sonido que emite, similar al de una abeja; la puesta se produce en los miembros posteriores del bovino y en lugares fácilmente accesibles para la mosca. Depositán un huevo de cada vez, con lo cual han de multiplicar el número de aproximaciones al hospedador. Por el contrario, *H. lineatum* apenas molesta al hospedador durante la oviposición, depositando cada vez los huevos en hileras de 6-15 en los pelos de los miembros anteriores, papada y cuello. En ocasiones la mosca desde el suelo se acerca a los animales que se encuentran tumbados para depositar los huevos. De acuerdo con Colwell y Berry (1993), las hembras de *H. bovis* poseen un mayor número de receptores químicos y mecánicos que las de *H. lineatum*, ya que debido a su forma de puesta necesitan mayor sensibilidad a la hora de localizar al hospedador.

La aparición en la naturaleza de formas intermedias entre *H. bovis* e *H. lineatum* ha llevado a algunos autores a estudiar la posibilidad de hibridación entre ambas especies. Weintraub (1961) tras varios intentos llevados a cabo sin éxito en el laboratorio, llegó a la conclusión de que no era posible la hibridación. Más tarde, Weintraub y col. (1968) demostraron que las formas intermedias no eran el resultado del cruzamiento de las dos especies de *Hypoderma*, ya que sólo se manifestaban en los estadios de L-1 y L-2, tanto procedentes de infestaciones naturales como experimentales. A pesar de la ausencia de una barrera morfológica que impida la fecundación cruzada de ambas especies, ésta no ocurre.

Además, ninguno de los huevos depositados por hembras a las que se les había transferido esperma de la otra especie mostró desarrollo embrionario.

En el interior del huevo el embrión es inmóvil hasta que eclosiona a los 3-4 días de la puesta; la salida se produce a través de una fisura que se abre en la cubierta del huevo por acción directa de la larva. En cuanto al desarrollo embrionario, Pruett y Kunz (1996) comprobaron que los huevos de *H. lineatum* no toleran una exposición prolongada a bajas temperaturas, siendo el límite inferior para el desarrollo embrionario de 20°C. Por otra parte, estos autores afirman que las condiciones en la piel del ganado vacuno resultan propicias para el desarrollo embrionario puesto que la temperatura no desciende de 25°C.

Las L-1 recién eclosionadas descienden por el pelo con movimientos ondulatorios vermiformes, guiadas por estímulos térmicos. Karter y col. (1992) demostraron que las larvas recién eclosionadas presentaban termotaxia positiva pero no fototaxia ni geotaxia. Posteriormente, las larvas penetran activamente en el tejido subcutáneo, aprovechando frecuentemente la depresión que rodea a los folículos pilosos; a esto contribuye el esqueleto cefálico, las enzimas proteolíticas y las espinas quitinosas que las recubren. Nelson y Weintraub (1972) comprobaron que si a los 15 minutos de la eclosión las larvas todavía no habían penetrado en la epidermis, perdían vigor, se deshidrataban y morían.

Las L-1 son endoparásitos obligados que se desarrollan en anaerobiosis, puesto que emigran profundamente a través del tejido conectivo del hospedador. Chamberlain (1964) comprobó que las L-1 pueden vivir mucho tiempo sin oxígeno o con niveles muy bajos, lo que no implica que no puedan usarlo. La **migración** de las larvas 1 por los tejidos del hospedador se produce gracias a las enzimas presentes en sus secreciones salivales (Boulard y col., 1988a). Estas enzimas, después de haber destruido los tejidos, se acumulan en el intestino medio de las larvas.

La migración intraorgánica de las larvas difiere según la especie; *H. lineatum* se desplaza por el tejido conjuntivo laxo intermuscular de la parte anterior del pecho y del abdomen, siguiendo líneas paralelas a los vasos sanguíneos, aunque no entra en ellos ni en los músculos, hasta la submucosa esofágica, preferentemente en su tercio caudal que es su lugar de estacionamiento o “reposo invernal”. También es frecuente encontrarlas en otros lugares distintos de la submucosa esofágica; Khan (1971) y Panadero y col. (1998, 2007) señalan su presencia bajo la serosa que recubre externamente al esófago. Otros autores



(Hadwen y Fulton, 1924 y Wolfe, 1959, cit. Panciera y col., 1993) han observado larvas 1 de *H. lineatum* en tejido conectivo peritraqueal y periesofágico, pleura parietal y peritoneal, pericardio, peritoneo visceral del hígado, bazo, rumen e intestino, diafragma, músculos intercostales y tejido conjuntivo perirrenal.

Durante esta fase de reposo, las larvas aumentan hasta seis veces su tamaño, llegando a alcanzar los 12 mm de longitud. Cox y col. (1970), Panadero y col. (2007) y Quintero-Martínez y col. (2007) comprobaron que, tanto las larvas situadas en la submucosa esofágica como las observadas en la superficie externa del esófago y tráquea, se encontraban orientadas longitudinalmente a estos órganos.

Las larvas de *H. bovis* realizan una emigración calificada por Ruíz (1982) como "órgano-neurotropa", en la que emigran lentamente siguiendo los ejes conjuntivo-nerviosos, desplazándose paralelas a los nervios isquiático y radial hasta alcanzar los plexos sacro, lumbar y braquial, tardando en recorrer este trayecto unos 4 meses. El lugar de reposo de *H. bovis* es la grasa epidural del canal raquidiano, especialmente de la región torácica y lumbar, entre la 8ª vértebra torácica y la 6ª lumbar. Estas larvas entran y salen del canal medular a través de los orificios intervertebrales (Beesley, 1962).

Después de un periodo de reposo en el raquis o en el esófago, las L-1 de *Hypoderma* reinician su migración hacia los lugares de maduración bajo la piel del dorso.

Gingrich (1970) comprobó que las larvas de primer estadio son parásitos obligados que solo completan su desarrollo en los bovinos, de modo que, cuando son implantadas subcutáneamente en animales de experimentación como el ratón blanco de laboratorio, migran generalmente hacia las cavidades torácica y abdominal, donde son encapsuladas por tejido conjuntivo y mueren sin lograr salir al exterior.

Una vez en el **dorso de los bovinos** comienzan a mudar a larvas 2; para ello invierten su posición y liberan todo el contenido enzimático a través del intestino posterior, lo que provoca un orificio en la piel del hospedador de 1-3 mm de diámetro, a través del cual se ponen en contacto con el exterior e inician una vida aeróbica; posteriormente se produce la muda a L-3.

La primera muda larvaria estimula la formación de una reacción granulomatosa por parte del hospedador, rodeando a la larva, y formando un nódulo larvario, también denominado “bubón” o “barro”. Las larvas 2 y 3 se nutren de restos tisulares y del contenido purulento del granuloma, creciendo muy rápidamente ya que en tres meses han de acumular las reservas necesarias para la pupación (1 mes) y vida adulta, periodos durante los cuales el insecto ya no se alimenta. Boulard (1968) y Boulard y col. (1988a) observaron que su tubo digestivo está abierto en los dos extremos, y posee una dotación enzimática rica en proteasas. Mediante pruebas radioactivas, Kasting y McGinnis (1966) establecieron algunos de los requerimientos nutricionales de las L-3 de *H. bovis*; comprobando que la metionina, fenilalanina, tirosina, leucina, histidina, lisina, isoleucina, valina y treonina son esenciales para su nutrición.

En cuanto a la **distribución de los nódulos larvarios** en el dorso de los bovinos, la mayor parte se localiza en un área de 25 cm a ambos lados de la línea media dorsal, desde la cruz hasta el comienzo de la cola (Kettle, 1990). En vacas infestadas por *H. bovis*, Hiepe y col. (1969) detectaron un elevado porcentaje de nódulos en la región lumbar (78,94%), y en menor proporción en la región dorsal (20,19%) y en la grupa (0,87%), no encontrando ningún nódulo por delante de la escápula. Por el contrario, en un estudio realizado por los servicios veterinarios del Ministerio de Agricultura francés (Anónimo, 1983) en una región en la que predominaba *H. bovis*, la mayoría de los nódulos se hallaron en la región dorsal (47,4%) y lumbar (42,6%), mientras que en la cruz, grupa y cuello solo se encontraron el 5,5, 4,4 y 0,1%, respectivamente.

Borchert (1964) señala que el tiempo medio de permanencia de las larvas en los nódulos varía con las especies; para *H. bovis* se prolonga 11 semanas (variando entre 8,5-14 semanas), mientras que para *H. lineatum* es de 7,5 semanas (oscilando entre 6-9 semanas).

Una vez que las larvas han completado su desarrollo abandonan los nódulos a través del orificio por el que respiran, ayudadas por los movimientos y las contracciones musculares del hospedador y de la propia larva, caen y penetran en suelo o se ocultan entre la vegetación, donde se preparan para pupar. Aunque las larvas de ambas especies son lucífugas, las de *H. lineatum* se entierran más profundamente que las de *H. bovis*. Tras el endurecimiento de la cutícula se produce una compleja metamorfosis que, dependiendo de las condiciones climáticas, en aproximadamente 2 a 5 semanas, dará lugar a una mosca adulta.

### 2.1.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE *Hypoderma* spp.

A lo largo del ciclo de *Hypoderma*, la mortalidad varía en función de la fase de desarrollo, así Breev (1971) estima la mortalidad en la fase de huevo en un 5-10%, la de las L-1 en un 70% y del 20-30% para las larvas 2 y 3. Minar y Breev (1982) calculan que, durante el paso de larva 3 a pupa, la mortalidad es del 6,85%, mientras que durante la fase de pupa, puede oscilar mucho, variando según la humedad entre un 45-93%.

Son varios los factores que influyen en el desarrollo de *Hypoderma*, interviniendo por una parte en la cronología de los periodos peligrosos para la salud animal y por otra, en la intensidad de parasitación.

#### 2.1.3.1.- FACTORES EXTRÍNSECOS O MEDIOAMBIENTALES

La biología de *Hypoderma* spp., al igual que sucede con el resto de los insectos, está muy condicionada por los factores extrínsecos o medioambientales. El clima influye directamente sobre la evolución de los estadios libres del parásito, interviniendo tanto en la cronobiología del parásito como en la intensidad de parasitación. De este modo, la programación de campañas de lucha y erradicación de la hipodermosis en una determinada región debe apoyarse en el conocimiento previo de los períodos aproximados en los que tienen lugar las distintas fases del ciclo y las adaptaciones resultantes de las condiciones climáticas registradas cada año; esto adquiere especial importancia en el caso del tratamiento preventivo, ya que ha de administrarse al ganado una vez que la actividad de las moscas adultas haya cesado, pero antes de que las L-1 alcancen los lugares de estancia invernal.

Con respecto a la **cronobiología**, diversos autores (Tarry, 1980; Boulard y col., 1988a; Martínez-Gómez y col., 1988; Prieto y col., 1990; Lonneux y col., 1991 y Panadero y col., 1993, 1994a, 2000a) han señalado que, las temperaturas altas, días soleados y ausencia de viento,

favorecen el desarrollo del ciclo, mientras que días nublados o tormentosos y vientos fuertes lo dificultan o retrasan.

La distribución de las 2 especies de *Hypoderma* diferirá según el área geográfica, aunque en una misma zona pueden coexistir los dos ciclos, que normalmente no se superponen completamente en el tiempo. En conjunto, el ciclo dura de 8-11 meses y, en condiciones normales, sólo hay una generación de moscas al año. En climas templados el ciclo de *H. lineatum* se adelanta uno o dos meses respecto al de *H. bovis* (Pfadt, 1947; Tarry, 1981; Boulard y col., 1988a y Berkenkamp y Drummond, 1990) y estas diferencias pueden ser mayores en zonas con condiciones climáticas extremas, como sucede al este de las Montañas Rocosas en América del Norte (Scharff, 1950), o en regiones áridas de Irak (Abul-Hak, 1973). En España, Talegón (1969), Martínez-Gómez y col. (1988) y Panadero (1996) realizaron un seguimiento del ciclo biológico de las 2 especies de *Hypoderma* y observaron que el vuelo y el periodo de puesta de *H. lineatum* se adelantaba al menos 1-2 meses con respecto a *H. bovis*.

En el sur de España la cronobiología de *Hypoderma* se aproxima a la señalada para los países norteafricanos. Así, Martínez-Gómez y col. (1988) comprobaron que las moscas estaban activas desde febrero a finales de mayo; observando las L-1 en el esófago y raquis desde principios de abril hasta mediados de enero y los barros en tejido subcutáneo del dorso entre mediados de noviembre y finales de mayo. Reina y col. (1994) comprobaron que, desde octubre a abril, era posible detectar L-3 en el dorso del ganado. La aparición de moscas se concentraba entre los primeros días de marzo y comienzos de mayo, mientras que las L-1 de *H. lineatum* podían observarse en los esófagos desde septiembre a diciembre. Asimismo, Hurtado (1999) en la alta Extremadura, comprobó que las larvas 3 estaban presentes desde octubre hasta mayo, mientras que el período en que pueden ser observadas las L-1 de *H. lineatum* en el esófago va de septiembre a diciembre, ambos inclusive.

En la provincia de León, Cordero (1962) observó que los adultos de *H. bovis* y la puesta de los huevos se efectuaba entre finales de junio y mediados de septiembre, mientras que la emigración larvaria a lo largo de los nervios hacia la zona subcutánea del dorso, tenía lugar entre julio y febrero.

En la mayor parte de Galicia, la cronobiología de la hipodermosis según Díez y col. (1995) y Panadero (1996) se ajusta al siguiente modelo: desde mediados de mayo a septiembre tiene lugar el vuelo de las moscas, la puesta de los huevos y el inicio de la

migración larvaria. Entre agosto y finales de diciembre, las larvas 1 se encuentran en los lugares de estancia invernal. Desde octubre hasta enero, se completa la migración larvaria hacia el dorso y entre diciembre y junio se detectan la mayoría de los nódulos larvarios subcutáneos. No obstante, como ya señalamos anteriormente, esta cronología varía de un año a otro en función de la climatología; así, Panadero (1996) observó que en los años en que las condiciones climáticas eran favorables para el ciclo de *Hypoderma*, éste se adelantaba 1 ó 2 meses respecto a aquellos en los que la meteorología era más adversa. En diversos estudios realizados en Galicia, se ha visto tanto por inmunodiagnóstico como por diagnóstico directo que los porcentajes de parasitación en las zonas costeras son menos elevados que los del interior (Panadero y col., 1994a, 2000b, 2000b, 2007; Castillo, 2003).

Los adultos de *Hypoderma* spp. son especialmente vulnerables a las condiciones adversas, de modo que la **intensidad de parasitación** está influida en gran medida por las condiciones climáticas. Las moscas están activas en los días soleados, con temperaturas próximas a 18°C. La luz del sol interviene en el éxito de la puesta, de modo que en años con veranos fríos y húmedos, la infección de los bovinos en la primavera siguiente es menor, debido a una oviposición incompleta por parte de las moscas adultas. El contacto con el hospedador y la eficacia de la puesta son mayores cuando las temperaturas son óptimas (Beesley, 1966 y Tarry, 1980).

Tarry (1980) encontró una correlación positiva entre la incidencia de la hipodermosis y distintos factores climáticos, sobre todo la temperatura media en los meses de verano (junio-agosto) y las horas de sol; la lluvia está correlacionada negativamente con la incidencia de la hipodermosis, aunque esta correlación no fue estadísticamente significativa. Según Walton (1928 cit. Tarry, 1980) la lluvia excesiva puede destruir larvas, pupas y adultos.

En este sentido, Weintraub y col. (1961) estudiaron la influencia de las elevadas temperaturas registradas en Texas sobre la reproducción de los adultos y la supervivencia de las pupas de *Hypoderma* spp., señalando que, a pesar de que los días lluviosos y nublados pueden impedir el apareamiento de las moscas, el factor medioambiental que actúa como limitante es la elevada temperatura registrada por la tarde, lo que hace que la puesta se produzca sobre todo por la mañana y a primeras horas de la tarde.

Yamov y col. (1990) consideran que la temperatura ambiental y la iluminación son los factores principales que determinan la actividad de *Hypoderma diana*, especie que parasita al ciervo.

Karter y col. (1992) trataron de inducir con luz artificial la oviposición de *Hypoderma tarandi*, cuyos hábitos de puesta son similares a los de *H. bovis*, pero sus intentos fueron infructuosos, de lo que dedujeron que las hembras de *Hypoderma* únicamente depositan los huevos bajo la luz natural del sol. Asimismo, comprobaron en condiciones de laboratorio que los huevos de *H. tarandi* únicamente evolucionaban a temperaturas comprendidas entre 20 y 37°C y que su desarrollo era más rápido cuando se incubaban con el 77% de humedad relativa que cuando se hacía con el 100%. Estas condiciones óptimas halladas en condiciones experimentales, coinciden con las del propio hábitat natural del hospedador donde *H. tarandi* fija sus huevos, cerca de la piel y de la base del pelo.

De acuerdo con Pfadt (1975), la formación de las pupas tiene lugar en un amplio intervalo de temperaturas, 14-26°C para *H. lineatum* y 14-25°C para *H. bovis*, lo que indica que las pupas de *H. bovis* toleran menos las altas temperaturas, pudiendo condicionar esta diferencia la distribución de las dos especies. El periodo de pupación de *H. lineatum* oscila entre 11 días a 26°C y 35 días a 16°C, mientras que para *H. bovis* es de 14 días a 28°C y 47 días a 16°C.

Kettle (1990) basándose en resultados obtenidos por otros autores, señala que en zonas de clima templado, como sucede en el sur de Inglaterra, la salida de las larvas o prepupas del animal acontece a primeras horas de la mañana, mientras que en zonas con clima más frío, como en Canadá, la salida se produce alrededor del mediodía. Una vez en el suelo, las larvas pueden sobrevivir bajo la nieve, y tras el endurecimiento de la cutícula incluso pueden sobrevivir a -28°C. A 20°C el desarrollo de *H. lineatum* es independiente de la humedad, mientras que para *H. bovis* el nivel óptimo de humedad es del 76%.

En la antigua URSS, Solopov (1988) encontró que cuando las larvas 3 de *H. tarandi* han madurado en el hospedador, su desprendimiento dependerá de que las temperaturas superen los 0°C, observando que se producía con temperaturas de más de 6°C e iluminaciones mayores de  $18 \times 10^3$  lux. De este modo, el 70-82% de las larvas abandonan el hospedador en las horas de más calor y luz del día (entre las 9.00 y las 15.00 horas). Cuando las larvas caen en suelo donde no hay hielo y si buena cubierta de hierba o musgo,

el 99% consiguen pupar y el porcentaje de moscas que eclosionan es del 75,1%. En suelos helados o cubiertos de nieve, el 77,4% de las larvas puparon, aunque la mortalidad fue progresiva y sufrieron un retraso de 15-24 días cuando había heladas. Si las larvas caen sobre roca limpia, con temperaturas sobre cero y alta iluminación, la mayor parte de las larvas (81,6%) morían a las tres horas, llegando a adultos tan sólo entre el 3,7% y el 5%.

Minar y Breev (1982) en la antigua Checoslovaquia observaron que la mayor parte de las L-3 abandonaban al hospedador por la mañana y que con temperaturas entre 15-20°C la larva se transformaba en pupa en 24-48 horas.

Weintraub y col. (1961) comprobaron que las elevadas temperaturas registradas en el sur de los Estados Unidos (Texas) provocaban la muerte de las pupas, sobre todo de *H. lineatum*, lo que coincide con lo observado por Tarry (1980), quien comprobó que, con temperaturas altas y ambiente muy seco, la mortalidad de las larvas era elevada, debido a que resultaba difícil la penetración en el suelo.

Breev y col. (1980) estudiaron la influencia de temperaturas constantes o alternas sobre el desarrollo pupal de *Oestrus ovis*, obteniendo peores resultados con temperaturas constantes, debido probablemente a la falta de algún estímulo del tipo del incremento de la temperatura matinal que ocurre en condiciones naturales.

Chamberlain (1989) encontró que aproximadamente un 18,5% de las larvas 2 y 3 de *H. lineatum* conseguían pupar en un medio artificial suplementado con penicilina, estreptomicina y nistatina, aunque tan solo un 3,7% lograba eclosionar; mientras que, en *H. bovis* lo hacían el 5%, aunque el porcentaje de L-2 que mudaron a L-3 (32,5% vs. 8%) fue mayor.

La salida de las moscas de los puparios tiene lugar en un intervalo más reducido de temperatura que para la pupación. Las moscas de *H. lineatum* no emergen a temperaturas inferiores a 14°C ni superiores a 28-31°C, siendo la óptima a 20°C. Pfadt y col. (1975) observaron que a temperaturas constantes de 20°C se obtenía un 72% de adultos, mientras que con temperaturas entre 15 y 25°C conseguían el 86% de adultos.

Scholl (1990) en una revisión sobre posibles enemigos naturales de las L-3 libres de *Hypoderma* spp., señala diversos géneros de bacterias, insectos, moluscos, pájaros y

roedores. Solopov (1988) observó que cuando las larvas caen en superficies húmedas de madera, se produce una mortalidad superior al 47,4% debido a infecciones fúngicas; comprobando asimismo que las hormigas rojas (*Formica rufa*) actuaban también como depredadoras. Posteriormente, Okunev (1990) señaló que las larvas activas de *Fannia* spp. eran grandes depredadores de las pupas de *H. bovis*.

### 2.1.3.2.- FACTORES INTRÍNSECOS O DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR

En la incidencia de la hipodermosis también tienen mucha importancia los factores intrínsecos o dependientes del hospedador, entre los que destacan la especie, edad, raza y sexo. Respecto a la **especie**, los bovinos son hospedadores específicos, aunque ocasionalmente caballos, ovejas, rumiantes silvestres, etc. y el mismo hombre, también pueden resultar afectados.

En relación con la **edad**, numerosos autores (Gingrich, 1980; Pruett y Barrett, 1984; Chauvin, 1987; Baron y Colwell, 1991b; Benakhla y col., 1993; Panadero y col., 1994a, 2000a, Castillo, 2003) afirman que los animales de mayor edad presentan prevalencias e intensidades de infestación más bajas, probablemente debido al desarrollo de una cierta protección como consecuencia de contactos previos con las larvas parásitas.

Por otra parte, Weintraub y col. (1961) y Gingrich (1980) señalan que los bovinos más jóvenes tienen cierta resistencia innata, que disminuye con la edad, y que se traduce en una elevada mortalidad larvaria (65-75%) durante el trayecto migratorio y especialmente cuando atraviesan la piel del hospedador. No obstante, con respecto a la edad, realmente lo que influye es el estado inmunitario determinado por el número de contactos previos que el animal haya tenido con el parásito. En este sentido, Benakhla y col. (1993) y Panadero y col. (1994b) encontraron mayor intensidad de parasitación en los bovinos con más de una temporada de pastoreo respecto de los que salían por primera vez al pasto.

La influencia de la **raza** no está suficientemente aclarada, sin embargo en Francia, Chauvin (1987) comprobó que los bovinos charoleses eran más sensibles a la infestación por



*Hypoderma* que los de otras razas. Asimismo, Navarrete y col. (1993) y Panadero y col. (1994a) en diferentes zonas de España, señalaron que la seroprevalencia de hipodermosis es mayor en vacas frisonas que en las procedentes de cruces. Igualmente, Benakhala y col. (1993) en Argelia, comprobaron que las frisonas tenían en general mayor número de barros que las "Montbelliarden" y lo relacionaron con las distintas características de la piel. Asimismo, Charbon y Pfister (1992) encontraron una relación entre el grosor de la piel y la tasa de parasitación.

No obstante, en trabajos posteriores Panadero y col. (2000b) y Castillo (2003) encontraron seroprevalencias más elevadas en razas como la Rubia Gallega, criada tradicionalmente en un régimen extensivo o semiextensivo, lo cual aumenta las posibilidades de estar en contacto con las moscas. Este hecho, señala al sistema de explotación como un factor importante que influye sobre la infestación.

Con respecto al **sexo** del hospedador, Folstad y col. (1989), en renos parasitados por *H. tarandi*, observaron que las hembras y los machos castrados presentaban niveles de parasitación más bajos, relacionándolo con la menor capacidad para desarrollar una respuesta inmune de los machos, ante las altas concentraciones plasmáticas de corticosteroides.

#### 2.1.4.- PATOGENIA

La infestación por larvas de *Hypoderma* provoca importantes efectos nocivos en los tejidos del hospedador, debidos sobre todo a la acción mecánica ejercida por sus apéndices cefálicos y también a la acción proteolítica e inmunitaria de sus secreciones salivales (Lecroisey y col., 1983). Esta acción patógena está condicionada en gran medida por la intensidad de parasitación y por la resistencia de los hospedadores lo que, a su vez, está condicionado por factores como contactos anteriores con las larvas parásitas y el estado sanitario general de los animales.

Las larvas que salen de los huevos atraviesan activamente la piel del animal, aprovechando la depresión que rodea los folículos pilosos, pero si transcurridos unos

minutos no han encontrado un lugar apropiado para la penetración, se desecan, pierden su movilidad y mueren sin lograr su objetivo. El líquido incoloro que rodea a las larvas recién eclosionadas, además de impedir su pronta desecación, también contribuye en opinión de Nelson y Weintraub (1972), a la lisis enzimática de los tejidos, en la que también toman parte activa los apéndices cefálicos o cefalo esqueleto de las L-1 y las espinas quitinosas que las recubren.

Las L-1 de *Hypoderma* spp. utilizan las enzimas segregadas por sus glándulas salivales para lisar y digerir el tejido conjuntivo e inhibir la formación de fibrina, limitando la posibilidad de enquistamiento. Boulard (1969) indicó que la digestión discurre fuera de la larva, y posteriormente ésta reabsorbe parcialmente sus enzimas junto con los productos de degradación del tejido del hospedador y los almacena en el intestino medio, que está cerrado en su extremo final por un tapón celular. Estas enzimas son sintetizadas durante la fase migratoria, desde que salen de los huevos hasta que mudan a L-2 en el dorso del hospedador. La digestión realizada por las enzimas cumple al menos dos fines: la nutrición de la larva, mediante la predigestión de los tejidos próximos, y la protección del parásito frente a reacciones inflamatorias del hospedador.

Una vez atravesada la piel, las larvas inician la emigración por el tejido conjuntivo hasta llegar a la submucosa esófagica en el caso de *H. lineatum* (Imagen 4) y a la grasa epidural en el canal medular en el de *H. bovis*. Durante los varios meses de emigración de las larvas además de desplazarse y aumentar su tamaño, dejan tras de sí trayectos gelatinosos y hemorrágicos con abundantes infiltrados leucocitarios.



**Imagen 4.- Larvas 1 de *H. lineatum* en la submucosa esofágica**

En los lugares de reposo, la reacción del hospedador difiere dependiendo de que se trate de una primoinfestación o reinfestación. Según indica Boulard (1985), con las infestaciones sucesivas la reacción perilarvaria en la mucosa esofágica se intensifica de modo considerable. Tras su permanencia en estas localizaciones, las larvas 1 emprenden de nuevo la migración hasta alcanzar la posición subcutánea en el dorso del hospedador y allí mudar a larva 2 y 3.

Después de la primera muda larvaria, se establece comunicación entre la parte del intestino medio y la posterior, lo que permite la expulsión del contenido acumulado durante la fase de primer estadio larvario; la liberación de estas enzimas en el tejido subcutáneo del hospedador conlleva lisis de la dermis y la epidermis, lo cual facilita el contacto de las larvas con el exterior.

Según Berkenkamp y Drummond (1990), la muda de las L-1 en el dorso propicia una reacción granulomatosa que tiende a encapsular al 2º y 3º estadio larvario con un tejido conectivo fibroso denso que rodea totalmente la larva dentro de un nódulo que la aísla en cierta forma del sistema inmune del hospedador. Beesley (1966) afirma que las L-3 están en un ambiente relativamente aislado y estable, evita asimismo infecciones secundarias al disponer de sustancias bacteriostáticas. De acuerdo con Boulard (1979), no parece existir comunidad antigénica entre las larvas de los tres estadios.

Finalmente, la salida de la larva 3 y consiguiente perforación de la piel del dorso, ésta puede ser una vía de entrada de gérmenes patógenos, pudiendo originar abscesos que afectan incluso a los músculos próximos. Asimismo se forma tejido cicatricial que lleva consigo depreciación de las pieles después del curtido.

En los últimos años, numerosos investigadores han centrado su trabajo en el estudio de las **respuestas patógena, antigénica e inmunitaria ante las secreciones larvarias**. Su obtención resulta fácil a partir de un homogeneizado de L-1 denominado extracto total o somático, a pesar de que, en opinión de Pruett y Barrett (1984), las proteínas solubles obtenidas de esta forma corresponden sobre todo a las secreciones enzimáticas contenidas en el intestino larvario, más que a antígenos procedentes del tegumento o tejidos larvarios.

Martínez-Moreno (1992) obtuvieron un antígeno de excreción-secreción incubando las larvas durante varias horas en un medio de cultivo RPMI-1640.

La purificación por cromatografía de intercambio iónico del extracto total larvario ha puesto de manifiesto la existencia de tres proteínas principales, denominadas hipoderminas A, B y C o colagenasas; estas enzimas, segregadas por las larvas durante su migración, pertenecen al grupo de las serin proteasas, que son enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia de la tripsina (Boulard, 1970 y Tong y col., 1981).

La hipodermina C identificada por Boulard (1970) y posteriormente caracterizada por Boulard y Garrone (1978) y Lecroisey y col. (1979), tiene un peso molecular de 24 kDa. Desde un primer momento llamó la atención su fuerte actividad colagenolítica, que favorece el paso a través de la piel y la migración de las L-1 a través del tejido conjuntivo profundo del hospedador. Según Lecroisey y col. (1979, 1983) y Lecroisey y Keil (1985) actúa destruyendo la triple hélice del colágeno y también se le atribuye cierta actividad caseinolítica aunque carece de actividad antiinflamatoria.

A la hipodermina A, descubierta más tarde por Tong y col. (1981), la caracterizaron como una serin proteasa con un peso molecular de 27 kDa. El análisis de su secuencia de aminoácidos sugiere una estructura homóloga a la de la colagenasa y, similar a la de otros miembros de la familia de las tripsinas.

La hipodermina B fue descubierta por Lecroisey y col. (1983), quienes, tras realizar una caracterización química y enzimática, la definieron como una serin proteasa con un peso molecular de 23 kDa.

Las hipoderminas A y B son similares a la collagenasa o hipodermina C por su secuencia de aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas; sin embargo, no poseen propiedades antigénicas, ni actividad fisiológica común con esta última; por el contrario, durante la migración de las larvas, éstas actúan muy activamente sobre la inhibición de la inflamación induciendo cierta inmunosupresión en el caso de primoinfestaciones, comprobándose que esta actividad se atenúa en las sucesivas reinfestaciones (Boulard y col., 1988b).

Schwinghammer y col. (1988), al purificar mediante cromatografía de intercambio iónico las distintas fracciones que componen el extracto total larvario de *H. lineatum*, hallaron cuatro picos que se correspondían con las hipoderminas A, B y C; además obtuvieron una fracción correspondiente al segundo pico de la separación (P2), cuya naturaleza exacta todavía se desconoce. Al comparar las propiedades bioquímicas e inmunoquímicas de esta fracción con las de las hipoderminas, verificaron que su actividad proteasa estaba más relacionada con la de la hipodermina B que con la A. Por otra parte, la existencia de reacciones inmunoquímicas cruzadas con la hipodermina B sugiere la existencia de semejanzas entre la hipodermina B y la denominada fracción P2. Del mismo modo, Moiré y col. (1994), al secuenciar las principales proteínas larvarias, encontraron una proteína muy relacionada con la hipodermina B (sus secuencias de ADN coinciden en un 95%), que podría representar una variante isomórfica de esa enzima.

Pruett y col. (1988) para estas tres fracciones obtuvieron pesos moleculares que difieren de los citados anteriormente, siendo 31,6 kDa para la hipodermina A, 25,1 kDa para la hipodermina B y 28,5 kDa para la hipodermina C. En cualquier caso, el peso molecular de las tres proteasas es bastante similar, por lo que, al hacerlas migrar electroforéticamente bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se obtienen tres bandas principales próximas entre sí, correspondiendo la banda que migra más rápidamente a la menos pesada, es decir, a la hipodermina B, seguida de la C y de la A. No obstante, a pesar de las similitudes, estas fracciones poseen una secuencia de aminoácidos que difiere en el contenido de residuos cargados, lo que hace que las tres fracciones posean movilidad electroforética bastante diferente en condiciones no desnaturalizantes (PAGE). Pruet y

Barrett (1984), mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones no desnaturalizantes, obtuvieron 14 bandas simples, siendo la hipodermina C la que emigraba más rápidamente, seguida por la B y de la A. Esta diferencia de carga facilita su separación mediante cromatografía de intercambio iónico, siendo actualmente un método de elección para la purificación inicial del extracto larvario de *H. lineatum* (Tong y col., 1981; Lecroisey y col., 1983; Pruett y Barrett, 1984; Pruett y col., 1988; Panadero, 1996, Morrondo, 1998; Morrondo y col., 1999).

Pruett y Barrett (1984) fraccionaron las proteínas presentes en un extracto crudo de *H. lineatum* mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando DEAE-A50 como intercambiador aniónico y eluyendo con tampón Tris-HCl 0,001M, pH 7,5 seguido por un gradiente de NaCl de 0 a 1M; obtuvieron 7 picos principales que posteriormente fueron identificados mediante PAGE y SDS-PAGE. Del mismo modo, Morrondo (1998) al estudiar mediante electroforesis (SDS-PAGE) el extracto total obtenido a partir de larvas 1 de *H. lineatum*, obtuvo tres fracciones separadas que identificó como hipodermis A, B y C, y de las que la HyB, cuyo peso molecular fue de 27,2 kDa, emigró más rápidamente.

En cuanto a su capacidad antigénica e inmunógena, Pruett y col. (1988), mediante "Western Blotting", estudiaron la cinética de anticuerpos en animales inmunizados con distintas fracciones proteicas purificadas a partir del extracto total obtenido de L-1 de *H. lineatum*. Concluyeron que la hipodermina C era la más inmunógena, puesto que a los dos m.p.i. se detectaban anticuerpos contra esta fracción, mientras que con la hipodermina A se observaban un mes más tarde, por lo que se consideró a estas dos hipodermis como los compuestos más inmunógenos del extracto larvario; no obstante, el hecho de que ambas se encuentren en grandes concentraciones al principio de la infestación, sugiere que la aparición temprana de anticuerpos podría deberse a estos antígenos. Diversos autores (Boulard, 1970; Boulard y Weintraub, 1973; Robertson, 1980; Gingrich, 1982; Pruett y Barrett, 1985; Boulard, 1985; Chauvin, 1987; Prieto y col., 1990 y Chabaudie y Boulard, 1993; Morrondo, 1998) han comprobado que la hipodermina C induce una rápida respuesta inmune, que se detecta dos meses después de la infestación; por lo tanto, desde 1970 la hipodermina C constituye el antígeno de elección para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina.

Las hipodermis resisten bien la autodigestión, incluso en condiciones de pH óptimas (Lecroisey y col., 1983) y permanecen intactas durante los 8 meses que dura la

migración larvaria intraorgánica en el hospedador. En condiciones desnaturalizantes la hipodermina B pierde antigenicidad, mientras que la A y la C, incluso en estas condiciones, conservan toda su capacidad antigénica (Pruett y col., 1988).

Las hipoderminas A y B están muy relacionadas entre sí compartiendo uno o varios epítomos; por el contrario, no comparten ningún epítomo o determinante antigénico con la hipodermina C (Lecroisey y col., 1983 y Pruett y col., 1988). Posteriormente, Moiré y col. (1994), al secuenciar las principales proteínas larvarias, observaron que las hipoderminas A y B poseen un 74% de similitud; mientras que la hipodermina C sólo presenta un 60% de similitud con la HyA y con la HyB.

La tecnología del ADN recombinante permite obtener productos proteicos de calidad antigénica comparable a los purificados a partir del parásito y en cantidad suficiente como para llevar a cabo análisis inmunológicos a gran escala. Lecroisey y col. (1987) describieron la secuencia completa de aminoácidos de la hipodermina C. Estos mismos autores junto con Tong y col. (1981) ya habían determinado las secuencias N-terminales de las hipoderminas A y B. Temeyer y Pruett (1990) llevaron a cabo el aislamiento del RNA mensajero, a partir de larvas 1 de *H. lineatum*, permitiendo de este modo la síntesis del DNA complementario para el clonado génico de las proteínas larvarias. Posteriormente, Moiré y col. (1994) secuenciaron y clonaron del ADNc que codifica a las tres hipoderminas larvarias. Más recientemente, Webster (1998) obtuvo hipodermina C recombinante, utilizando un fago gt11 expresado en *Escherichia coli*, si bien no fue capaz de aislarla de los extractos bacterianos. Quienes sí lo consiguieron fueron Casais y col. (1998), que expresaron el ADNc de la hipodermina C madura en *E. coli* como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) y la purificaron mediante cromatografía de afinidad, utilizando factor X<sub>a</sub> para romper la proteína de fusión. La proteína recombinante obtenida de esta forma mostró actividad enzimática en geles de poliacrilamida y en azocoll; además, mostró una inusual estabilidad a altas temperaturas, manteniendo su actividad intacta incluso después de dos horas de incubación a 70°C.

En estudios posteriores, Carballo (1999) y Panadero y col. (2000b) compararon, mediante ELISA e inmunoblotting, los resultados obtenidos con la hipodermina C recombinante con los hallados mediante el empleo del antígeno natural de *Hypoderma*. La sensibilidad del ELISA con el antígeno recombinante fue del 95,8% y la especificidad del 95,7%; mientras que con el antígeno natural obtuvieron un 98,2% para ambos parámetros.

Con el inmunoblotting, el comportamiento de ambos antígenos fue similar, por lo que concluyeron que este antígeno recombinante, era válido para el inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina en condiciones de campo, y que además constituía una buena alternativa frente al uso de antígenos parasitarios, en especial en los países con dificultad para obtener L-1 de *Hypoderma*.

Respecto a la especificidad y reacciones cruzadas entre los antígenos de *H. bovis* e *H. lineatum*, Petithory y Boulard (1979) comprobaron reacciones cruzadas importantes que pusieron en evidencia que entre ambas especies existían similitudes antigénicas; no obstante, en algunas ocasiones sólo se obtuvieron resultados positivos con el antígeno de *H. bovis*. Asimismo, Robertson (1980) confirmó la existencia de reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma* al detectar, mediante hemoaglutinación pasiva, títulos de anticuerpos en animales infestados experimentalmente con *H. bovis*, utilizando como antígeno extractos larvarios de *H. lineatum*. Igualmente, Khan (1981) detectó, mediante un test de reacción intradérmica, reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma*, empleando como antígeno un extracto larvario obtenido a partir de L-1 de *H. lineatum*. Posteriormente, Sinclair y Wassall (1983) observaron reacciones cruzadas entre *H. bovis* e *H. lineatum* mediante ELISA.

Las reacciones cruzadas entre las dos especies de *Hypoderma* no permiten reconocer mediante ELISA de qué especie se trata; sin embargo, con la inmunoelectroforesis, sí se puede identificar la especie que causa la parasitación en humanos (Doby y col., 1987a).

Por otra parte, destacan los efectos patógenos inducidos por larvas de *Hypoderma* que se manifiestan inmediatamente tras la destrucción de las larvas con un tratamiento otoñal, especialmente en animales muy parasitados y sobre todo cuando se realiza tardíamente (Boulard y col., 1988). Si la destrucción de las larvas tiene lugar al principio de la migración, la respuesta antigénica es débil, porque en esta fase las larvas son muy pequeñas (1-2 mm.) y todavía contienen dotación enzimática relativamente escasa. Sin embargo, conforme aumenta su tamaño, la liberación masiva de estos antígenos larvarios dará lugar a reacciones más intensas en el hospedador. De esta forma se pueden desencadenar fenómenos de hipersensibilidad inmediata y anafilaxia como los descritos por Boulard y col. (1988).

La reacción alérgica puede ser de 2 tipos: hipersensibilidad tipo III, en que la liberación masiva de antígenos implica la formación de complejos inmunes con sus anticuerpos específicos, lo cual a su vez conduce a un fenómeno de Arthus, e hipersensibilidad de tipo I, que podría reforzar la liberación de mediadores que se desarrollan en la reacción de tipo III.



Además de los efectos descritos, también es posible un efecto tóxico directo causando una importante afectación del sistema cardiorespiratorio. Según Boulard y col. (1991), este efecto tóxico puede ser también indirecto, ya que la liberación masiva de antígenos larvarios, sobre todo de las hipodermis A y B, pueden sobrepasar la capacidad de actuación de los anticuerpos, siendo así liberados en exceso a los tejidos. Beesley (1966) y más tarde Eyre y col. (1981) estudiaron los efectos de la inyección de extractos larvarios sobre el hospedador, descubriendo que, en animales no sensibilizados, se produce una reacción inflamatoria tisular local, acompañada de una depresión del sistema cardiorespiratorio mientras que, en animales sensibilizados, se producía un verdadero choque anafiláctico.

### 2.1.5.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la hipodermosis se evidencian durante la fase de puesta de las moscas o en la fase subcutánea, cuando empiezan a aparecer las larvas en el dorso en forma de nódulos dolorosos a la palpación, pero son menos evidentes, en general, durante la emigración intraorgánica de las larvas. Por este motivo, se considera a esta miasis como una enfermedad zootécnica, es decir, que cursa con escasa sintomatología, que no suele preocupar al ganadero, pero que, se manifiesta por reducción de las producciones, que será tanto más importante cuanto mayor sea la tasa de parasitación, aunque las pérdidas totales debidas a esta parasitosis no son fácilmente cuantificables.

El sonido producido por las moscas al volar, similar al zumbido de una abeja, causa temor y reflejo de huida en los animales, provocándose lesiones con cercas, paredes o alambradas, caídas, abortos, etc., al tratar de buscar refugio. Las carreras y desplazamientos bruscos de los animales se contagian al rebaño y dan lugar a auténticas estampidas. La excitación es más importante con *H. bovis* por el modo de puesta individual que realiza, que supone el vuelo constante alrededor de los animales.

Las manifestaciones clínicas generales durante la prolongada fase de emigración son escasamente aparentes y se traducen en un retraso del crecimiento de los animales más jóvenes y cierto grado de enflaquecimiento de los adultos y, en particular, se resiente la

producción láctea. Pueden detectarse también disfagias pasajeras ante la inflamación de la pared esofágica. Cuando las larvas que emigran por el peritoneo son numerosas, hay peritonitis y también cojeras pasajeras o paresias de distinta intensidad, dependiendo de la localización de las larvas y sus fases de desarrollo.

En caso de infestaciones importantes, la sintomatología es más manifiesta debido en buena medida a la liberación masiva de enzimas durante la migración de las larvas y se presenta con mayor intensidad en casos de tratamiento incorrecto. Las manifestaciones se asemejan a las de una intoxicación por insecticidas organofosforados, incluyendo fuerte salivación, esofagitis, problemas digestivos con meteorización aguda, temblores y estado apático con evolución normalmente favorable en 24-48 horas (Boulard, 1991; Levasseur, 1991).

Eyre y col. (1981) comprobaron que la inoculación de un extracto de larvas 1 de *H. lineatum* filtrado y purificado en los bovinos jóvenes produce alteraciones cardiorrespiratorias, observándose hipotensión carotídea e hipertensión arterial, disnea y dificultades respiratorias.

La presencia de las larvas en el dorso origina forunculitis más o menos intensa en dependencia con el grado de inflamación; está acompañada de reacción dolorosa, prurito y malestar general, más acentuado en los animales jóvenes, en los que suele coincidir con infestaciones importantes. En los adultos estas manifestaciones son menos evidentes.

Con la salida de las larvas, en los meses de primavera-verano, la pequeña herida cicatriza rápidamente y se recupera el estado general, a lo que contribuye también la mejora de los pastos en ese período.

Se sabe que las enzimas segregadas por las larvas durante su migración desempeñan un papel esencial para la supervivencia de las L-1 debido a una acción antiinflamatoria e inmunomoduladora. Esta acción que garantiza el éxito de la infestación, también puede favorecer el desarrollo de otros procesos patógenos. En este sentido, Araujo-Chaveron (1994) señalaron como muy probable la influencia negativa de *Hypoderma* sobre el normal funcionamiento del sistema inmune de los bovinos y advirtieron que la hipodermosis se correlaciona con un incremento de la incidencia de ciertas enfermedades como metritis, mastitis, meteorismo, neumonía, tos, abortos y cojeras, así como con lesiones cutáneas y no tanto con ciertos tipos de diarreas.

### 2.1.6.- LESIONES

La infestación por *Hypoderma* spp es responsable de alteraciones locales o generales debidas a la acción patógena de las fases larvarias del parásito, especialmente por el papel inmunológico de las secreciones liberadas y por la acción mecánica e irritativa ejercida durante su migración intraorgánica.

La **reacción en el punto de entrada** es diferente dependiendo del número de infestaciones que haya sufrido el animal con anterioridad; así en animales primoinfestados, las larvas penetran sin dificultad, ya que la reacción celular es débil, limitándose a una ligera infiltración eosinofílica. No obstante en casos de reinfestaciones se generan fuertes reacciones edematosas alrededor de la L-1, formándose un exudado seroso que aglutina los pelos alrededor de los puntos de penetración (Hawden y Fulton, 1924). En ocasiones, sobre todo en animales de piel clara, pueden observarse zonas petequiales próximas a la raíz de los pelos; microscópicamente, se observa un infiltrado de células inflamatorias, eosinófilos y restos de fibras de colágeno (Nelson y Weintraub, 1972). Simmons (1937) destaca la escasez de neutrófilos en zonas próximas a las larvas. En bovinos muy sensibilizados pueden apreciarse pequeñas zonas de necrosis, irritación, inflamación, costras epidérmicas y erizamiento del pelo. En estos animales la piel actúa como una verdadera barrera debido a la intensa respuesta celular que en ella se produce y que dificulta mucho o impide la entrada de nuevas larvas. En este sentido, Nelson y Weintraub (1972) comprobaron que al suprimir la reacción cutánea de base celular, mediante la administración de ACTH a bovinos previamente infestados, aumentaba de forma significativa el número de larvas que lograban superar la barrera cutánea.

López y col. (2005) estudiaron la respuesta inmune celular que tiene lugar en la piel de ganado primo y reinfestado mediante infección experimental con larvas de *Hypoderma lineatum*. Evidenciaron que en las infecciones secundarias se desarrolla una respuesta celular que lograría destruir a algunas larvas durante la entrada, dando lugar a un cierto grado de resistencia. Las biopsias de piel de animales primoinfestados se caracterizaron por una respuesta inflamatoria moderada. Los cambios celulares que detectaron en los animales previamente infestados sugirieron el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo III. Asimismo, a las 48 h.p.i. detectaron una infiltración perivascular formada por linfocitos T CD3<sup>+</sup>, especialmente intensa en animales previamente infestados, con un aumento significativo

respecto a los testigos no infestados. A partir de las 6 h.p.i. las células plasmáticas IgG<sup>+</sup> fueron significativamente más abundantes en las infestaciones secundarias.

Dacal y col. (2009) determinaron, mediante inmunohistoquímica y ELISA sándwich, que durante la infestación por *H. lineatum* se produce un aumento en las citoquinas, tanto de tipo Th1 (IFN-gamma) como de tipo Th2 (IL-4 e IL-10), por lo que durante las primeras fases de la infestación la respuesta es de tipo Th0. Las células IL-4<sup>+</sup> mostraron un aumento significativo a las 6 h.p.i. en los animales reinfestados, pero descendió significativamente a las 48h.pi. Las células IL-10<sup>+</sup> aumentaron en los animales primoinfestados a las 6 y 48 h.p.i., mientras que en animales reinfestados por 1ª y 2ª vez el aumento se observó a las 12 h.p.i., con un máximo a las 48 h.p.i. Las células IFN-γ<sup>+</sup> mostraron un incremento significativo a las 6 h.p.i en todos los grupos, seguido de un rápido descenso a las 12 h.p.i. en los animales infestados por segunda vez y a las 48 hpi en los infestados por tercera vez. Estos autores también comprobaron la falta de correlación entre la producción local y las concentraciones séricas de las diferentes citoquinas, con excepción de la IL-10.

Durante la **migración hacia los lugares de reposo** las larvas se desplazan y aumentan de tamaño, induciendo una reacción inflamatoria aguda que va acompañada de vasodilatación, y dejando a su paso trayectos gelatinosos con abundante infiltrado leucocitario. A ello se añade la destrucción del tejido conjuntivo que rodea a la larva por acción directa de sus secreciones que son ricas en colagenasa, glicoproteasa y elastasa. Alrededor de las larvas hay una reacción edematosa, hiperémica, con infiltrado eosinofílico y abundantes fibras de colágeno irregulares y parcialmente destruidas. En el exudado que rodea a la L-1 se aprecian bandas de fibrina, algunos glóbulos rojos, linfocitos y eosinófilos; estas larvas vivas normalmente no aparecen encapsuladas por tejido fibroso. La alteración tisular y la reacción edematosa alrededor de las L-1 se acentúan con el crecimiento de éstas (Boulard, 1975).

En su migración, siguiendo los planos aponeuróticos de los músculos de la parte anterior del cuerpo, las L-1 de *H. lineatum* ocasionan, principalmente, lesiones inflamatorias locales en el tejido conjuntivo del mediastino, pleura, pulmones y diafragma. Estas lesiones se caracterizan macroscópicamente por la presencia de focos de edema gelatinoso, amarillento o verdoso y microscópicamente se observa que el tejido edematoso está infiltrado por un trayecto denso de eosinófilos (Panciera y col., 1993).

En los **lugares de reposo** de las larvas de *Hypoderma* spp. la reacción del hospedador también difiere según se trate de primoinfestación o reinfestación. En cualquier caso, en estas localizaciones no suele haber mortalidad larvaria ya que, en condiciones normales, la mayoría de las larvas que llegan al esófago o al canal raquidiano se movilizan después hacia el dorso.

En la **submucosa esofágica** las larvas de *H. lineatum* originan un edema gelatinoso con focos amarillentos acompañados con frecuencia de hemorragias petequiales alrededor de ellas. En la primoinfestación las lesiones son de escasa entidad, ya que hay un ligero edema y el color de la submucosa es blanquecino, mientras que en animales reinfestados la migración de la larva por la submucosa esofágica determina la aparición de un intenso edema gelatinoso de color amarillento, acompañado de trayectos hemorrágicos; este cuadro se confirma a nivel microscópico, donde se observa una infiltración eosinofílica y macrofágica más acentuada en las proximidades de la larva (Arru y col., 1985). Por otra parte, López y col. (1999b) comprobaron que las lesiones en esófagos parasitados iban desde las apenas visibles, hasta trayectos fuertemente hemorrágicos. A menudo las larvas estaban rodeadas de un intenso edema gelatinoso de color amarillento que, en ocasiones, afectaba prácticamente a todo el esófago. En algunos esófagos se encontraron formaciones quísticas de consistencia dura, en cuyo interior se hallaron larvas. El examen histológico de la mayor parte de los esófagos, mostró un infiltrado inflamatorio perivascular constituido por células plasmáticas y/o macrófagos y polimorfonucleares eosinófilos. Ocasionalmente se apreció un intenso infiltrado eosinofílico alrededor de las larvas, y en otros animales se observó también miositis, sobre todo en la capa muscular interna del esófago, con atrofia de parcial de las fibras musculares.

Boulard (1975) describió histológicamente tres zonas alrededor de las larvas esofágicas: una capa prelarvaria, que se corresponde con el primer estadio de una reacción inflamatoria y que se manifiesta por alteraciones vásculo-sanguíneas; sin destrucción tisular, pero con una importante vasodilatación e infiltración leucocitaria; en la zona perilarvaria, se distinguen, a su vez, tres partes: en la más externa, el tejido aparece edematoso, no existe destrucción tisular, pero las fibras de colágeno están distendidas y dissociadas; este tejido está infiltrado por eosinófilos, numerosos monocitos, neutrófilos y algunos linfocitos; el segundo nivel se caracteriza por la degradación de todas las estructuras fibrosas del tejido y, por último, el plano más cercano a la larva que se corresponde con la última etapa de degradación, se encuentra separado de la cutícula larvaria por una capa fina y amorfa constituida por las secreciones de sus glándulas salivales. Finalmente, se encuentra la zona postlarvaria, que

presenta las mismas etapas de destrucción tisular que la anterior, pero se observa una evolución hacia la cicatrización.

Tras la aplicación tardía de un tratamiento precoz a animales infestados con *H. lineatum* aparecen en la submucosa esofágica intensos edemas gelatinosos de color amarillento, que reducen considerablemente la luz esofágica; existe también inflamación aguda con trayectos congestivos y hemorrágicos, que afectan a la mucosa y a las capas musculares del esófago (Boulard y col., 1991).

En el **canal raquidiano** de animales infestados por *H. bovis* y más concretamente en la grasa perineural, se observan lesiones edematoso-hemorrágicas más o menos extensas y nódulos de varios milímetros de diámetro de color gris-amarillento, cuya consistencia varía de pastosa a dura. Histológicamente, se observan dos cuadros típicos, uno caracterizado por la presencia de trayectos necrótico-hemorrágicos ricos en fibrina, ampliamente infiltrados de eosinófilos y rodeados por un tejido de granulación intensamente vascularizado, y en el que predomina el componente macrofágico-eosinofílico, y otro con una rápida evolución hacia un tejido granulomatoso, con infiltración de macrófagos, linfocitos, células epiteliales y células gigantes (Arru y col., 1985).

Sergent (1941), a pesar de no haber observado lesiones macroscópicas en la médula espinal de animales parasitados por *H. bovis*, afirma que a veces pueden aparecer hemorragias y coágulos epidurales que la comprimen, sobre todo en la región dorso-lumbar, entre la 5ª vértebra torácica y la 6ª lumbar, y que originan problemas locomotores. Durin y Peres (1953) describen el caso curioso de un novillo en el que se encontraron tres larvas de *H. bovis* que habían seccionado parcialmente la médula a nivel de las vértebras dorsales.

Khan (1971) encontró en el canal raquidiano de bovinos infestados por *H. bovis* y tratados con organofosforados, trayectos congestivos y hemorrágicos con infiltración serosanguinolenta que afectaba al tejido adiposo del espacio epidural y a la membrana serosa que limita el canal vertebral. En algunas ocasiones aparecían pequeños coágulos en las áreas hemorrágicas, situados cerca o rodeando los orificios intervertebrales. Las larvas aparecían en la grasa epidural, o cerca de las áreas que mostraban congestión o decoloración.

Tras su permanencia en los lugares de reposo, las L-1 emprenden de nuevo la migración para alcanzar la posición subcutánea en el **dorso del hospedador** y allí mudar a L-2 y L-3. Después de la primera muda larvaria en el dorso, se produce la expulsión de todo el

contenido acumulado durante la fase de primer estadio, el cual estimula una respuesta inflamatoria crónica no supurativa que tiende a encapsular al 2º y 3º estadio larvario mediante tejido conjuntivo fibroso (Berkenkamp y Drummond, 1990). Los fibroblastos se muestran muy activos, dando lugar a abundantes fibras de colágeno que aíslan rápidamente a las larvas (Boulard, 1975).

López y col. (1999a) analizaron los cambios anatomopatológicos del tejido subcutáneo tras la llegada de las L-1 y antes de la formación de los nódulos larvarios. Macroscópicamente, en la cara interna de la piel, se observaron quistes de diferente tamaño que en ningún caso sobrepasaban los 1,5 cm de diámetro; así como los orificios practicados en la piel por las larvas 2. Microscópicamente, en el tejido subcutáneo se evidenciaron trayectos longitudinales con restos de tejido necrosado acompañados de reacción inflamatoria con infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares eosinófilos. En una de las muestras observaron una reacción inflamatoria granulomatosa, con abundantes macrófagos y células epitelioides, indicativa de la formación del nódulo larvario. También encontraron zonas de abscesificación de las áreas de necrosis de los trayectos larvarios en cuya luz había restos celulares y abundante infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos.

Este quiste, que corrientemente se denomina “barro”, es similar a un forúnculo y rodea a la larva. En torno a ella hay un contenido sanguinolento y purulento con restos de tejidos que crece con rapidez. Marcato (1990) describe macroscópicamente estos nódulos como duros, elevados y circunscritos, cuyo tamaño oscila entre 1 y 5 cm de diámetro. Histológicamente, los nódulos más recientes, aún no perforados, tienen una cavidad interna con tejido de granulación infiltrado por granulocitos y alrededor hay también una capa fibrosa.

Las lesiones nodulares antiguas, ya perforadas, tienen un orificio rodeado de tejido epitelial pavimentoso-estratificado que se extiende internamente hasta el fondo de la cavidad; debajo se ha formado tejido conjuntivo fibroso con granulocitos y en él también pueden hallarse focos hemorrágicos (Marcato, 1990). La abertura externa, inicialmente tiene 1-2 mm pero más tarde llega a 5-6 mm. Inmediatamente después de la salida de la L-3 se cierra el orificio con tejido granuloso cicatricial aunque, a veces, los restos del parásito retrasan su cicatrización. Ocasionalmente, en los nódulos se produce calcificación lo que hace que sean más persistentes en el dorso del animal.

## 2.1.7.- DIAGNÓSTICO

### 2.1.7.1.- DIRECTO

El diagnóstico directo deriva del conocimiento del ciclo interno del parásito y de la observación de los distintos estadios del ciclo de *Hypoderma* en el hospedador. Puede llevarse a cabo en el matadero, en cuyo caso se trata de un examen *post-mortem* que pone en evidencia las larvas 1 de *H. lineatum* en la submucosa del esófago y las de *H. bovis* en la grasa epidural. Su pequeño tamaño y aspecto transparente dificulta su observación en el matadero; no obstante, la posibilidad de trasladar los esófagos y la grasa epidural al laboratorio para realizar su examen de forma meticulosa, facilita su hallazgo, lo que permite obtener datos más precisos sobre la prevalencia y, en especial, sobre la cronología del ciclo biológico de ambas especies.

Fernández (2005) y Panadero y col. (2007) al estudiar la prevalencia y la cronología de la fase esofágica de *Hypoderma lineatum* en Galicia observaron que las L-1 se detectaban durante 10 meses, de mayo a febrero. La prevalencia de 18,2% con máximos en julio y octubre, siendo la prevalencia en la zona costera fue significativamente menor que en otras zonas. La intensidad de infestación fue baja ( $7,6 \pm 6,2$ ), no detectándose diferencias significativas en la intensidad de infestación entre las distintas zonas climáticas. Estos resultados ayudan a establecer el momento adecuado para la aplicación de insecticidas sistémicos, teniendo en cuenta que los bovinos deberían tratarse de acuerdo con su área geográfica o climática para evitar las reacciones adversas derivadas de su uso tardío.

Beesley (1966) para detectar mejor las larvas de *H. bovis*, orientaba el examen a las canales que tuvieran la grasa epidural decolorada, ya que de acuerdo con sus resultados, el 52% de los animales con decoloración albergaban larvas de *H. bovis*. Para facilitar la recogida, mantenía la grasa recogida del canal medular en agua a 35-40°C varias horas para que las larvas presentes flotaran.



Los exámenes directos en el matadero también permitirán poner de manifiesto la presencia de larvas 2 y 3 en la cara interna de las pieles en los bovinos sacrificados, en especial durante la época primaveral.

Durante mucho tiempo, el método de elección para el diagnóstico de la hipodermosis ha sido el recuento *in vivo* de los nódulos larvarios mediante observación o palpación directa del dorso. El recuento de los barros permite hallar correctamente los niveles de infestación de una región, siempre y cuando se refieran a un número elevado de rebaños; es, por lo tanto, un diagnóstico que refleja la situación parasitaria real y actual de una determinada zona. Sin embargo, el recuento de los nódulos conlleva numerosos inconvenientes prácticos, ya que es difícil de estandarizar, resulta poco objetivo, implica la palpación de los animales de pelo largo, lo cual supone un obstáculo, sobre todo en primavera cuando los animales se encuentran en el pasto. Por otra parte, implica la realización de controles repetidos, ya que la permanencia de las larvas en el dorso varía entre 1,5-3,5 meses y el periodo de máxima emergencia oscila de un año a otro. En general, se considera que para asegurar la detección de la mayoría de las larvas se necesita un recuento mensual entre marzo y julio (Chauvin y col., 1988). También hay que resaltar su escasa sensibilidad si lo comparamos con los métodos inmunológicos ya que tan sólo detecta un 50% de los animales que hayan resultado infestados en el verano precedente, puesto que con frecuencia las fases parásitas no completan su desarrollo, debido a la respuesta inmunitaria del hospedador o al aplicar un tratamiento temprano.

#### 2.1.7.2.- INMUNOLÓGICO

El diagnóstico precoz de la hipodermosis ha sido uno de los principales problemas a resolver en la lucha contra esta miasis, ya que para evitar la acción patógena del parásito y para poder realizar el tratamiento en las primeras fases migratorias, se debe detectar la presencia de larvas en el hospedador al principio de la infección.

Los principales métodos utilizados hasta el momento para el diagnóstico indirecto o inmunológico se basan en la investigación de anticuerpos circulantes formados frente a los antígenos metabólicos secretados por las glándulas salivales de las L-1.

Nelson y Knapp, ya en 1961, demostraron mediante una técnica de floculación la presencia de anticuerpos en el suero de novillas y conejos inoculados con extractos de larvas 2 y 3.

Desde los años 70 han sido muchos los intentos para poner en práctica nuevas técnicas capaces de detectar anticuerpos específicos, sobre todo en el campo de la hipodermosis humana, entre las que cabe mencionar, la doble difusión en gel, la inmunoelectroforesis, la hemoaglutinación pasiva y las técnicas inmunoenzimáticas.

La **hemoaglutinación pasiva** (HAP), puesta a punto por Boulard en 1970, se considera un procedimiento específico y sensible para el diagnóstico de la hipodermosis humana, pero su sensibilidad en los animales varía en función de la duración de la infestación, siendo más alta cuanto más antigua sea la infestación. Asimismo, para la hipodermosis humana Senet y col. (1982) demostraron que la hemoaglutinación era más sensible que la inmunoelectroforesis o la inmunofluorescencia indirecta.

Boulard y Petithory (1977) detectaron un 76% de casos positivos de hipodermosis humana mediante **doble difusión en gel**, empleando un antígeno de *H. lineatum* e *H. bovis*; no obstante, se produjeron reacciones cruzadas con antígenos de *Gasterophilus intestinalis*.

La **inmunoelectroforesis** utilizada con éxito por Doby y col. (1987a) en la hipodermosis humana, tiene su mayor inconveniente en la necesidad de niveles altos de antígeno y disposición de grandes cantidades de suero, así como varios días para leer los resultados; no obstante, es capaz incluso de diferenciar la especie que causa la infección.

Tanto la doble difusión como la inmunoelectroforesis son efectivas en la detección de anticuerpos en el curso de la hipodermosis humana, sin embargo, no identifican anticuerpos frente a larvas migrantes en la hipodermosis bovina (Monfray y Boulard, 1990).

Khan (1981) desarrolló una **prueba intradérmica** destinada a detectar bovinos infestados con *Hypoderma* spp.; para ello elaboró antígeno a partir de L-1 de *H. lineatum* y comprobó la presencia de reacciones dérmicas en los bovinos parasitados tanto con *H. bovis* como con *H. lineatum*.

Para el diagnóstico hospitalario de la hipodermosis humana, Doby y col. (1986) utilizaron la **electrosinéresis**. Este método se revela particularmente viable ya que reúne, por una parte, la gran especificidad de la IEF y, por otra, la rapidez y necesidad de poca cantidad de antígeno como sucede en el ELISA y HAP.

Doby y col. (1987b) idearon un ELISA para el diagnóstico de la hipodermosis humana, que detecta IgG e IgE específicas, con el que demostraron resultados similares para ambas inmunoglobulinas, con la diferencia de que las cifras de densidad óptica de las IgE eran más bajas. Según estos autores las IgE se detectan un poco más tarde que las IgG, pero también persisten más tiempo.

Doby y col. (1987a) señalaron que el ELISA y la hemoaglutinación pasiva (HAP) son dos métodos que permiten el diagnóstico precoz de la hipodermosis humana, mientras que con la inmunoelectroforesis se conoce mejor la evolución de la enfermedad.

Sinclair y Wassall (1983) pusieron a punto una técnica **ELISA** para el diagnóstico de la hipodermosis bovina, adaptando el método de Ruitenbergh y Buys (1976), utilizando placas de microtitulación e insertando una inmunoglobulina extra (rabbit anti-bovine IgG) entre el suero problema y el inmunoconjugado (goat anti-rabbit IgG), con fuertes reacciones positivas en todos los animales infestados, incluso en los que había una sola larva.

Boulard (1985) señaló las ventajas del inmunodiagnóstico de la hipodermosis bovina mediante hemoaglutinación pasiva y ELISA a partir del suero y lactosuero. El lactosuero puede facilitar la toma de muestras para el diagnóstico; no obstante, la intensidad de la respuesta inmunitaria no siempre está correlacionada con la del suero, puesto que las diferencias de densidad óptica registradas en la leche pueden variar también en función del estado inflamatorio de la mama. Asimismo, Chauvin (1987) utilizó el ELISA para el diagnóstico de la hipodermosis en suero y lactosuero. Posteriormente, Boulard y Villejoubert (1991) utilizaron mezclas de suero y lactosuero de 10 animales y los estudiaron mediante ELISA; y determinaron la época del año más apropiada para llevar a cabo el muestreo.

Colwell y Baron (1990) estudiaron 300 vacas durante un periodo de tres años, mediante ELISA y palpación-observación directa de los barros en el dorso, y comprobaron que con el ELISA un 5% de los animales eran falsos positivos, es decir eran positivos por ELISA pero no tenían barros. El hecho de que la mayor parte de esos falsos positivos mostraran niveles

similares o incluso superiores a los que presentaban barro, hizo pensar que estos animales habían estado infestados, pero las larvas no lograron completar su migración hasta el dorso, y quedaron en el tejido subcutáneo antes de llegar a formar nódulos. También se ha comprobado, en zonas en las que coexisten las dos especies de *Hypoderma*, que los animales infestados sólo por *H. bovis* daban respuesta negativa por ELISA, especialmente si la toma de sangre se llevaba a cabo muy pronto y/o solo de forma puntual.

Boulard (1985) señaló las ventajas del inmunodiagnóstico por hemaglutinación y por ELISA sobre el recuento de las larvas en el dorso. Con las dos primeras técnicas el diagnóstico se realiza con un único suero y una sola toma de muestras, mientras que el recuento de los barro requiere el examen directo de los animales y repetirlo varias veces para que los resultados sean satisfactorios.

La técnica ELISA detecta animales infestados por *Hypoderma* spp; sin embargo, no se puede valorar bien la intensidad de parasitación de los animales. Lysyk y col. (1991) desarrollaron un modelo matemático que permite predecir el número medio de barro por animal en un rebaño, partiendo de la proporción de animales no infestados.

Losson y Lonneux (1991) utilizaron un kit comercial de ELISA (Clonatec Hypodermose<sup>®</sup>) para la detección serológica de la hipodermosis en tres granjas diferentes de Bélgica, y obtuvieron buena correlación entre la serología y el examen directo; tan sólo encontraron 4 falsos negativos en el grupo de los animales más viejos y resistentes y 4 falsos positivos entre los bovinos que habían sido tratados antes de que las larvas alcanzasen el dorso. Asimismo, obtuvieron buena correlación entre el ELISA, con un kit comercial y la palpación del dorso de los animales.

Chauvin y col. (1988) compararon los distintos métodos utilizados para el diagnóstico de la hipodermosis, la técnica más sensible fue el ELISA utilizando suero seguido por la HAP y, en menor grado, el ELISA empleando lactosuero. Por el contrario, el más específico fue el recuento de los barro, seguido por el ELISA en suero y la HAP.

Webster y col. (1997a) describieron un ELISA de competición para la detección de anticuerpos frente a las diferentes especies de *Hypoderma* en sueros bovinos, con una sensibilidad del 100% y especificidad del 92%. Estos autores afirmaron que esta prueba ELISA

resulta un complemento muy útil para el ELISA sándwich estándar, sobre todo en los casos de resolución de muestras que muestran propiedades de unión no específica.

Panadero y col. (2002) pusieron a punto un ELISA sándwich para la detección del antígeno HyC, y en un estudio posterior (Panadero y col., 2007) evaluaron su uso para el diagnóstico de infestaciones en condiciones de campo, comprobando que la HyC estaba presente en la circulación en niveles bajos durante las fases tempranas y tardías de la infestación y que había dos máximos de concentración coincidiendo con la presencia de L-1 en el esófago. Además observaron que los niveles de antígeno no se correlacionaban con el número de barrotes en el dorso. Así pues el ELISA de captura es una buena herramienta para seguir el desarrollo de las larvas en el hospedador, resultando limitada su utilidad para el diagnóstico precoz en condiciones de campo debido a la elevación episódica de los niveles de HyC.

Colwell y col. (2008) observaron que la dinámica de circulación de la HyC en ganado previamente infestado era similar a la de los primoinfestados. Estos autores también confirmaron que se desarrollaba una respuesta inmunitaria significativa durante la infestación primaria que se reflejaba en la generación rápida y apreciable de anticuerpos tras la reinfestación.

Webster y col. (1997b) estudiaron la presencia de anticuerpos frente a las especies de *Hypoderma* en explotaciones de Inglaterra, Escocia y Gales, países en los que no se permiten bovinos seropositivos. Estos autores afirmaron que la sensibilidad de las pruebas serológicas supera ostensiblemente la de la observación directa.

La obtención y uso de los **antígenos**, su elaboración y uso ha ido evolucionando con el tiempo. Robertson (1980) demostró la ausencia de reacciones cruzadas entre los antígenos de las L-1 y L-3, aunque sí detectó escasa respuesta anticuerpo dirigida frente a las L-2.

Boulard y Weintraub (1973) en infestaciones experimentales de conejos con L-1 de *Hypoderma* spp vieron que la colagenasa larvaria era uno de los antígenos básicos para la detección temprana.

Monfray y Boulard (1990) realizaron una evaluación preliminar de cuatro técnicas inmunológicas (doble inmunodifusión en gel, inmunoelectroforesis, hemaglutinación pasiva y

ELISA) para el diagnóstico de *H. tarandi* en el reno, obteniendo los mejores resultados con el ELISA y con larvas 1 como fuente de antígeno.

Martínez-Moreno y col. (1994), al comparar los resultados del ELISA con antígeno somático y de excreción-secreción, obtuvieron mejores resultados con éste último, porque se podían establecer más diferencias entre sueros positivos y negativos.

Prieto y col. (1990) mediante ELISA pudieron diferenciar mejor los animales infestados de los no infestados utilizando como antígeno la hipodermina C purificada por HPLC de fase reversa, en lugar de un extracto bruto de las L-1 de *H. lineatum*.

Desde la adaptación original de la técnica ELISA para el diagnóstico de la hipodermosis hasta hoy se han utilizado diversos protocolos. Martínez-Moreno y col. (1995) utilizaron un procedimiento en el que intercalaban una globulina intermedia para potenciar la reacción específica (Rabbit-antibovine IgG+Goat-antirabbit-HRP) y en otro caso emplearon una reacción directa (Anti-bovine IgG-HRP). A pesar de que la reacción inmunoenzimática fue más intensa al intercalar una globulina intermedia, la reacción directa discriminó mejor los positivos de los negativos.

Diversos autores (Doby y col., 1987a,b; Sinclair y Wassall, 1983) han comprobado que el ELISA no puede diferenciar la especie de *Hypoderma* que causa la infestación, pero no se detectaron reacciones cruzadas con otras especies de parásitos.

Martínez-Moreno y col. (1994) adaptaron la técnica del western-blotting para el diagnóstico de la hipodermosis con objeto de desarrollar un método más sensible y específico. Utilizaron como antígeno el extracto bruto, cuyas fracciones separaron mediante SDS-PAGE; tras su transferencia a la membrana de nitrocelulosa, emplearon la dilución del suero 1/600 y procedieron a la inmunorevelación mediante el sistema avidina-biotina. Tres de las 4 fracciones obtenidas por electroforesis, con pesos moleculares de 27, 23 y 21 kDa, daban reacción positiva al immunoblotting.

### **2.1.8.- RESPUESTA INMUNE EN LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma* spp.**

Las larvas 1 de *Hypoderma* emprenden una larga migración por el tejido conectivo laxo profundo del ganado bovino, donde se exponen continuamente a mecanismos defensivos del hospedador. Su supervivencia depende en parte de la evasión de las respuestas del hospedador y de la capacidad para modular el sistema inmunitario.

#### **2.1.8.1.- RESPUESTA INNATA**

Weintraub y col. (1961) comprobaron la existencia de resistencia innata en terneros infestados por *Hypoderma*. Esta resistencia, se expresa fundamentalmente en la piel y está asociada al aporte de vitamina A, produciendo mortalidades del 65-75% de las larvas en la fase de la penetración. A medida que los terneros crecen, la resistencia innata va disminuyendo y va siendo reemplazada por la resistencia adquirida, originada a partir del primer contacto con el parásito (Gingrich, 1980).

Boulard y Bencharif (1984) pusieron en evidencia la actividad inhibidora de las hipoderminas A y B sobre el complemento hemolítico bovino, lo que permite al parásito eludir la reacción temprana de defensa del hospedador. Debido a su importancia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, esta actividad es más intensa en los animales jóvenes que en los adultos infestados con anterioridad. Posteriormente, Boulard (1989) y Baron (1987) precisaron su mecanismo de acción degradando el factor C3 que controla el inicio de la respuesta inflamatoria y de la reacción inmune en ganado no infestado previamente, lo que contribuye sin duda a inhibir o atenuar estas reacciones y favorecer la supervivencia de las larvas en el hospedador. Consecuentemente, la supervivencia de las larvas en terneros supera a la de los animales de más edad. Baron (1990) señala que la hipodermina A es la más eficiente en la degradación del C3 bovino, ya que es capaz de degradar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ .

### 2.1.8.2.- RESPUESTA ADQUIRIDA

La resistencia adquirida comienza a desarrollarse a partir de la primera infestación del hospedador (Gingrich, 1980), pero no alcanza su máxima expresión hasta la tercera o cuarta infestación, apreciándose un descenso, en algunos casos muy notable, en el número de nódulos dorsales al tiempo que baja el porcentaje de la viabilidad en relación con las anteriores parasitaciones (Gingrich 1982; Pruett y Barrett, 1985; Baron y Weintraub, 1987b).

Por lo tanto, la respuesta del hospedador será distinta en función de que se trate de primoinfestación o reinfestación. Desde hace tiempo se sabe que animales mayores, que han sufrido otras infestaciones por *Hypoderma*, presentan ligeras tumefacciones y pequeños exudados en el lugar de penetración de las larvas, a la vez que muestran un número sensiblemente inferior de barro en el dorso en comparación con los más jóvenes.

Weintraub y col. (1961) demostraron que el número de larvas llegadas al dorso era inversamente proporcional al número de larvas infestantes, es decir, que a mayor número de huevos depositados en los pelos, menor número proporcional de barro y por lo tanto una mayor mortalidad larvaria, como consecuencia de la activación de la respuesta inmune.

Entre los factores más influyentes en la resistencia están la intensidad de parasitación, el número de reinfestaciones previas y las pautas de desparasitación. Se ha observado que animales con una importante infestación en un año, al siguiente fueron menos receptivos y, por el contrario, los infestados débilmente o tratados precozmente con un insecticida, tuvieron infestaciones más intensas la temporada siguiente (Evstafjev, 1980).

#### 2.1.8.2.1.- Respuesta celular

Gingrich (1982) sugirió la participación de respuesta de base celular en el desarrollo de la resistencia adquirida frente a la hipodermosis, al observar que los animales más resistentes a la infestación tenían, un mes después de la infestación, actividad MIF (Macrophage Migration



Inhibitory Factor) más elevada que los menos resistentes, al tiempo que reaccionaban más activamente a los antígenos de las larvas que penetraban en la piel.

Otros autores (Colwell, 1985 y Baron y Weintraub, 1987a) observaron correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular y el estado de protección en animales resistentes previamente infestados. De este modo, Baron y Weintraub (1987a) detectaron *in vitro* una respuesta linfoproliferativa antígeno-específica que variaba con las fases de la infestación y que se correlacionaba positivamente con la resistencia del hospedador, lo que sugería que la resistencia adquirida era de base celular con participación de linfocitos B y T. Así pues, en animales reinfestados, la respuesta celular es intensa durante los dos meses posteriores a la infestación, coincidiendo con la migración de las L-1 hacia los lugares de reposo, pero se mantiene relativamente baja con la permanencia de las L-1 en estas localizaciones, para intensificarse de nuevo cuando se reanuda la migración hacia el dorso y se forman los nódulos larvarios. Sin embargo, en animales primoinfestados esta reacción inmunitaria de base celular es más tardía.

Durante la invasión de la piel, la intensidad de la respuesta celular eosinofílica aumenta si ha habido exposiciones anteriores, observándose en el trayecto de entrada en animales reinfestados un abundante exudado eosinofílico próximo al extremo posterior de la larva. También se observa rápida elevación del nivel de eosinófilos en sangre que alcanza su máximo entre los 7-20 días posteriores a la entrada de la larva (Nelson y Weintraub, 1972; Nelson, 1987 y Colwell, 1987); estos niveles se mantienen relativamente altos durante la fase migratoria (Colwell, 1987), y se incrementan de nuevo coincidiendo con la aparición de las larvas en el dorso.

Nelson y Weintraub (1972) y Colwell (1987) encontraron una relación inversa entre la supervivencia larvaria en animales previamente infestados y los valores de eosinofilia.

Doby y col. (1987b) en casos de hipodermosis humana, observaron que la hipereosinofilia se mantiene mientras las larvas poseen una actividad secretora-excretora en los tejidos profundos, pero el número de eosinófilos vuelve a la normalidad cuando cesa esa actividad, es decir, cuando las larvas son neutralizadas por la respuesta serológica y tisular del organismo.

Colwell (1985) demostró correlación entre el nivel de eosinófilos circulantes, en animales previamente infestados, y el grado de resistencia. Así mismo, Panadero (1996) al relacionar los niveles de anticuerpos con el número de eosinófilos circulantes durante el ciclo de *Hypoderma lineatum*, comprobó que los niveles de anticuerpos se relacionaban con el ciclo, y precedían a la aparición del número máximo de barros, en el mes de marzo, para posteriormente descender rápidamente. La evolución de los eosinófilos circulantes fue paralela a la respuesta humoral, con un incremento durante la migración intraorgánica, para llegar al nivel máximo en el mes de diciembre, lo cual coincidía con el inicio de la llegada de las larvas al dorso del animal.

La proliferación de linfocitos (Baron y Weintraub, 1987) y la tasa de neutrófilos (Romaniuk, 1974) siguen curvas paralelas, incrementándose al inicio de la migración de las larvas, para elevarse de nuevo durante la migración al dorso.

Los resultados obtenidos por Pruett (1993) demuestran que la hipodermina A es capaz de desdoblar la inmunoglobulina G *in vitro*, dando lugar a un fragmento (fab)<sub>2</sub> mientras que los fragmentos de la cadena larga asociados al desdoblamiento de la fracción F<sub>c</sub> permanecen inalterados. La hipodermina A no sólo degrada las IgG bovinas, sino también las de otras especies, así como otras proteínas del ganado vacuno; además puede inactivar macrófagos y otras células implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune. La destrucción de la actividad biológica de las IgG bovinas sugiere la puesta en acción de un mecanismo de evasión que contribuye a la supervivencia de las L-1.

Colwell (1991) sugiere que en la superficie de las larvas 1 de *H. lineatum* hay compuestos que tenderían a reducir las respuestas inflamatorias del hospedador, con el consiguiente retraso en la instauración de la respuesta inmune.

El descubrimiento de que los antígenos derivados de las L-1 de *H. lineatum* estimulan la resistencia a la infestación ha promovido su uso para tratar de desarrollar vacunas que protejan artificialmente al ganado frente a la infestación por *Hypoderma* spp. Así, Magat y Boulard (1970) revelaron la posibilidad de inducir respuesta inmunitaria utilizando como antígeno la fracción colagenasa obtenida de L-1 de *H. lineatum* y parcialmente purificada. Aunque esta inmunidad se mostró incompleta si supuso la disminución del número de barros en infestaciones por *H. bovis* e *H. lineatum*.

Boulard y Lecroisey (1982) ensayaron un método rápido y simple para la producción de anticuerpos específicos en conejos inmunizándolos con tiras de poliacrilamida con pequeñas concentraciones de proteína. La desnaturalización de la proteína mediante SDS no modificó su antigenicidad y por otra parte los geles de poliacrilamida químicamente son inertes y no indujeron una reacción inmune en el conejo.

Baron y Weintraub (1986) inmunizaron un grupo de vacas con un extracto de L-1 de *H. lineatum* (antígeno somático) y otro grupo con el sobrenadante procedente de un cultivo de las mismas (antígeno de excreción-secreción). Ambos tratamientos redujeron un 50% los barros respecto a los testigos no inmunizados; la supervivencia de las larvas de *H. lineatum* se redujo significativamente con el antígeno somático, mientras que la de *H. bovis* se vio afectada con ambos extractos.

Pruett y col. (1987), en ganado bovino primoinfectado y vacunado con hipodermina A, consiguieron una mortalidad larvaria del 89,9%, frente al 35% en los primoinfectados no vacunados. Esta mortalidad superó incluso a la obtenida en animales sometidos a varias infestaciones (60,9%). Esta resistencia se mantenía durante más de un año después de la vacunación.

La hipodermina A se considera la más inmunógena y en este sentido, Pruett y col. (1989) demostraron que la disminución del número de larvas viables era mayor si se inmunizaba con hipodermina A purificada que si se hacía con una mezcla de hipoderminas B y C.

Chabaudie y col. (1991) ensayaron distintos protocolos de vacunación, empleando hipodermina A sola o combinada con el adyuvante incompleto de Freund; sin embargo, incluso con este protocolo de vacunación, se inducía una protección muy incompleta ante la infestación natural.

Baron y Colwell (1991a) observaron que, animales inmunizados con una combinación de hipoderminas A, B y C a la que se añadía un inmunoestimulante, el MPL, desarrollaban una respuesta celular antígeno-específica y humoral más marcada que la de los testigos infestados, y que se relacionaba con el grado de protección de esos animales.

Fisher y col. (1991) comprobaron que la hipodermina A induce una respuesta blastogénica linfocítica como resultado de la vacunación y/o infestación; sin embargo, no observaron correlación entre la magnitud de la respuesta antígeno-específica, la linfoproliferación periférica y la mortalidad larvaria.

Godon (1994) observó que la HyA e HyB inhiben la actividad quimiotáctica de los neutrófilos "*in vitro*" y Chabaudie (1987) comprobó que también se inhibe "*in vivo*", mientras que Barquet y col. (1992) afirmaron que modulan la expresión de las moléculas implicadas en la migración y reclutamiento de los neutrófilos.

Chabaudie y Boulard (1992) sugirieron que la HyA es la proteína larvaria con mayor actividad inhibidora sobre el sistema inmune del hospedador. De acuerdo con Nicolas-Gaulard y col. (1995) esta inmunosupresión provocada por la HyA puede ser debida a un aumento del nivel de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), molécula con fuerte capacidad antiproliferativa, secretada por monocitos y macrófagos. Además, Tarleton (1988) comprobaron que la PGE<sub>2</sub> inhibía la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por las células mononucleares durante la infección experimental con protozoos parásitos como *Leishmania* spp. o *Trypanosoma cruzi*.

Moiré y col. (1997) observaron que la hipodermina A interfería en la unión de algunos anticuerpos monoclonales (CD2, CD5, CD4, CD8, CD18) a la superficie de linfocitos y monocitos, lo que podría deberse a su acción enzimática, degradando algunos epítomos de estas moléculas aunque no la molécula completa. En un estudio posterior, comprobaron que determinados epítomos de la membrana de los linfocitos, necesarios para la activación y proliferación, eran degradados por la HyA (Moiré y col., 1997).

Khaznadji y col. (2003) compararon la HyA natural y recombinante observando que la HyA natural reduce en un 70% los linfocitos tipo CD4<sup>+</sup> y en un 90% los CD5<sup>+</sup>, mientras que la HyA recombinante los reduce en un 60% y 85%, respectivamente.

Chabaudie y Boulard (1993) observaron que la inyección de la hipodermina C a bovinos no infestados e infestados previamente no modificaba significativamente la respuesta linfocitaria a diferentes mitógenos, así mismo, tampoco influía negativamente en las respuestas celular y humoral específicas en los bovinos infestados.

La existencia de resistencia cruzada entre las hipoderminas de *H. lineatum* e *H. bovis*, especialmente con la HyC, llevó a pensar en la posibilidad de un producto vacunal polivalente. Pruett y col. (1988) comprobaron reactividad cruzada considerable entre ambas especies de *Hypoderma*, demostrando la existencia de epitopos compartidos, asociados en su mayor parte con la hipodermis C y A.

Los **eosinófilos** aparecen asociados con frecuencia a las infecciones parasitarias. La eosinofilia de origen parasitario es, en general, importante y tras la infección se eleva rápidamente hasta alcanzar un máximo para posteriormente disminuir en el curso de la enfermedad parasitaria. Son granulocitos cuyo citoplasma posee numerosas granulaciones de tamaño variable que incorporan colorantes ácidos como la eosina, en cuyo interior hay sustancias o principios activos tóxicos a la espera de agentes extraños, contribuyendo, de esta forma, a la defensa del organismo. Pueden fagocitar, al igual que los neutrófilos, partículas pequeñas, bacterias, hongos y complejos inmunes, si bien son más eficaces en la destrucción extracelular de grandes parásitos, ya que pueden descargar sus gránulos en el líquido que los rodea. Los eosinófilos abandonan la médula ósea en un estado relativamente inmaduro y se dirigen hacia el bazo, donde alcanzan la madurez. Su presencia en la sangre es transitoria (30 minutos), de modo que cuando el número de eosinófilos circulantes aumenta de modo considerable se trata de células que se dirigen hacia un territorio particular tras una agresión externa.

De todas formas, la hipereosinofilia varía en función de las condiciones del hospedador (edad, estrés, ciclo estral, etc.), así, en general, en los bovinos los niveles de eosinófilos aumentan con la edad y durante el estro (Bezille, 1993). En general, existe una relación entre la carga parasitaria y la respuesta eosinofílica, siendo el metabolismo parasitario y la migración tisular elementos claves de la hipereosinofilia.

Los **neutrófilos** son las células más importantes y abundantes del sistema mieloide; se forman en la médula ósea y emigran hacia la corriente sanguínea, donde permanecen aproximadamente 12 horas, antes de desplazarse hacia los tejidos. Son células polinucleadas cuya función principal es la captura y destrucción del material extraño que ha traspasado las barreras cutáneo-mucosas a través de la fagocitosis. Constituyen una primera línea de defensa que se mueve rápidamente hacia las sustancias extrañas y las destruyen con rapidez; sin embargo, sus limitadas reservas de energía condicionan que sólo sobrevivan durante unos días. Representan, por otra parte, uno de los eslabones de la reacción inflamatoria, ya que las

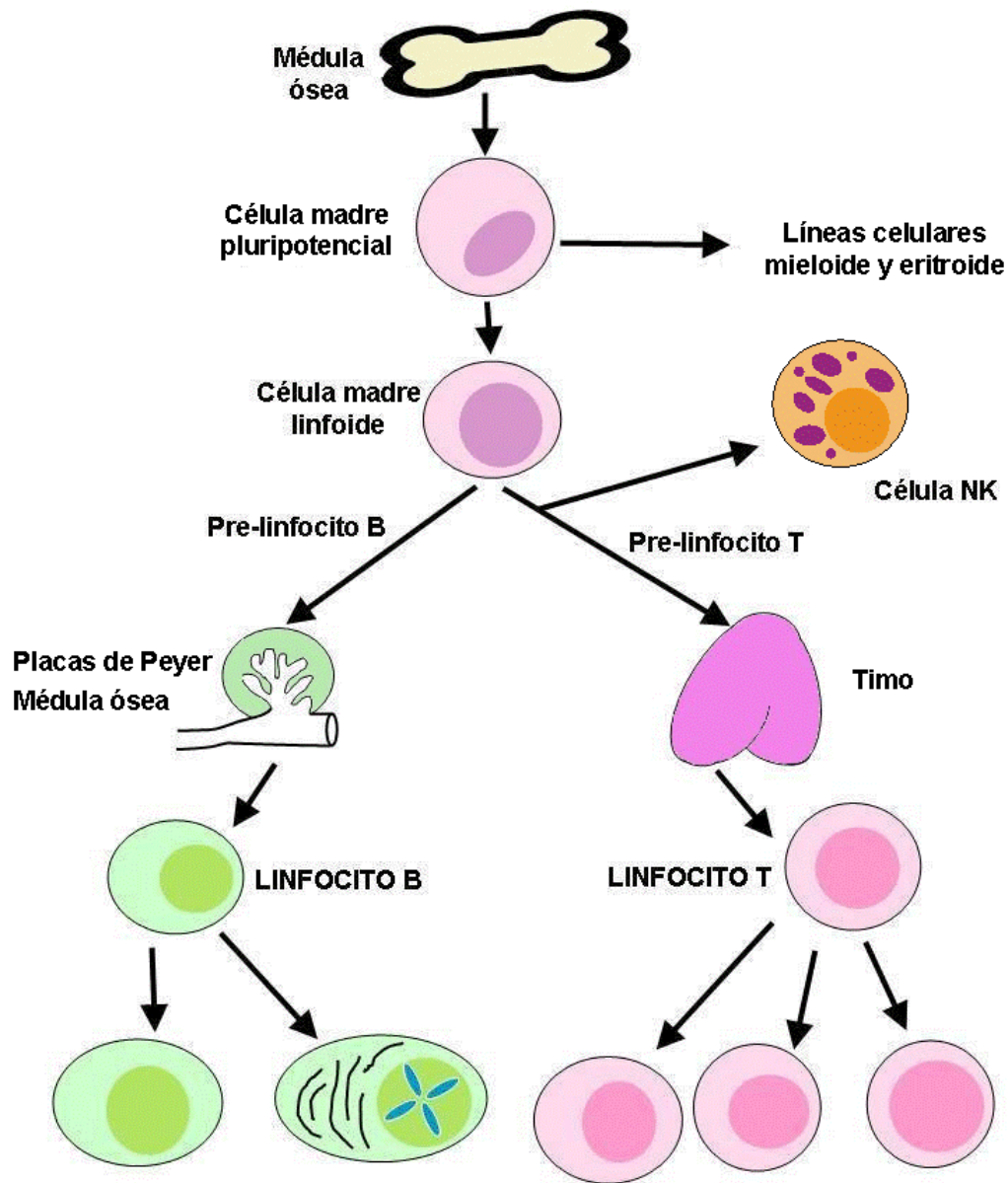
sustancias proteicas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos amplifican los fenómenos inflamatorios (Jongh, 1993).

Godon (1984) ha precisado el papel de las hipoderminas A y B en la inhibición *in vitro* de la migración quimiotáctica de los neutrófilos bovinos. Posteriormente, Chabaudie (1987) puso de manifiesto en un modelo murino el papel inhibitor de las hipoderminas A y B sobre la migración de los neutrófilos hacia los focos inflamados que rodean a las larvas.

Aunque los polinucleares **basófilos** sean, tanto en la sangre como en los tejidos, menos numerosos, sus funciones no dejan de ser importantes. Participan en diversas reacciones de mediación inmune, como la hemostasia, metabolismo de los triglicéridos, expulsión de ciertos parásitos y en la citotoxicidad humoral. La composición de sus gránulos, ricos en histamina, heparina, proteoglicanos, etc. explica la variedad de sus funciones. La aparición de un número importante de basófilos circulantes ha sido señalado en ciertos desórdenes alérgicos, en el curso de enfermedades parasitarias, tras la administración de determinados medicamentos como la heparina o en el curso de algunos procesos tumorales (Latimer y Rakich, 1989).

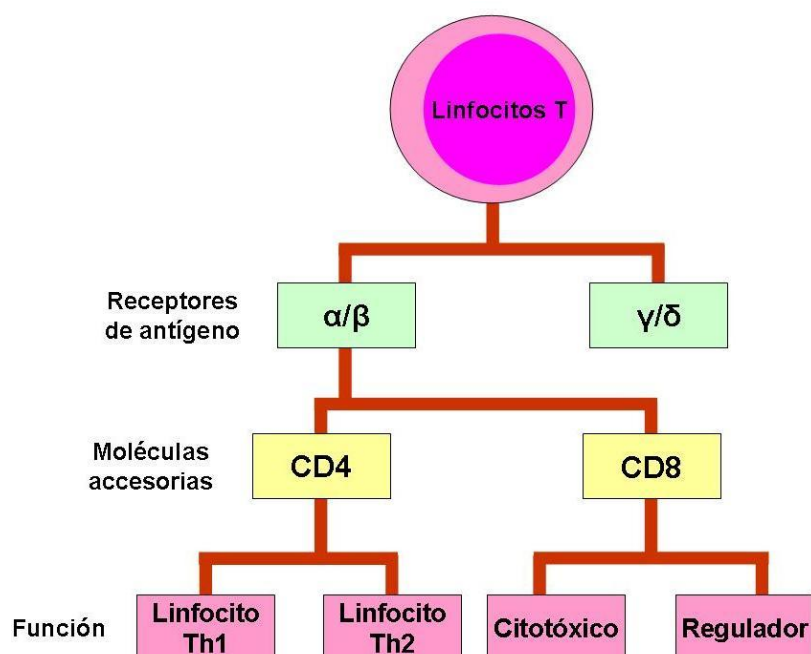
Los **monocitos** forman parte del sistema retículo-endotelial y se incluyen dentro del conjunto de los fagocitos mononucleares. Tras una corta estancia en la médula, su distribución sanguínea se reparte entre un sector marginal y otro sector circulante cuya vida no sobrepasa unas pocas horas. Después de su paso irreversible hacia los tejidos se transforman en macrófagos. Entre sus múltiples funciones se encuentran las de procesar los antígenos al efecto de prepararlos para su presentación ante las células sensibles a los mismos; también liberan una serie de factores solubles (monoquinas) e interaccionan con la superficie de células malignas u organismos invasores.

Los **linfocitos** son responsables de reacciones inmunitarias específicas. Desde un punto de vista funcional se distinguen dos poblaciones: los **linfocitos T**, que alcanzan la madurez en el timo y posteriormente pasan a los órganos linfoides secundarios (bazo y nódulos linfáticos), donde quedan almacenados o pasan a la circulación general; son los más numerosos en el compartimento sanguíneo y son responsables de las reacciones inmunitarias de mediación celular (Imagen 5).



**Imagen 5.- Desarrollo de los linfocitos T y B a partir de precursores de la médula ósea (Tomado de Tizard, 2009).**

En el transcurso de la hipodermosis, la proliferación de linfocitos y monocitos sigue una evolución paralela, aumentando al principio de la migración larvaria hacia los lugares de reposo, y de nuevo se intensifica esta respuesta durante la migración larvaria hacia el dorso (Romaniuk, 1973).



**Imagen 6.- Clasificación de los linfocitos T en subpoblaciones en función de los receptores antigénicos que utilizan y de las moléculas accesorias en que se basa su actividad. (Tomado de Tizard, 2009).**

Como ocurre en los restantes parámetros hemáticos y séricos, las diferentes etapas fisiológicas por las que pasa el animal (gestación, puerperio y lactación) sumadas a la influencia del ambiente, raza, aptitud, edad, clima y nutrición, condicionan las variaciones en los recuentos de leucocitos, así como en la interpretación de la serie leucocitaria. Según Bezille (1993), en los bovinos los factores que más influyen en las variaciones fisiológicas de los leucocitos son la raza y la edad, de modo que las de aptitud lechera poseen, por lo general, cifras de leucocitos menores que las de carne; además, se ha comprobado que el número de glóbulos blancos disminuye con la edad.



Rosenberger (1990) señaló como cifras medias para el ganado vacuno las siguientes:

|                     | JÓVENES   | ADULTOS  |
|---------------------|---|--|
| <b>Eritrocitos</b>  | $8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$<br>( $5-10 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) | $7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$<br>( $5-8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ )     |
| <b>Leucocitos</b>   | $8 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$<br>( $5-12 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) | $7,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$<br>( $5-10 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ )  |
| <b>Linfocitos</b>   | $6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$<br>( $4-10 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) | $4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$<br>( $2,5-5,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) |
| <b>Monocitos</b>    | 5% (2-8%)   |  |
| <b>Granulocitos</b> | $6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$<br>( $3-9 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ )  |  |

En lo que respecta a la serie roja, Schalm (1986) estudió los valores de **eritrocitos** en diversas razas bovinas; en la frisona los valores estaban comprendidos entre 7,2 y 10,8 millones/mm<sup>3</sup>. Romaniuk (1973) señaló un ligero descenso del número de glóbulos rojos, durante la fase migratoria de las larvas 1 de *Hypoderma* spp.

Lambert (1990) cita valores de **hematocrito** comprendidos entre 26 y 42%. En relación con la época del año, Ghergariu y col. (1984) hallaron en invierno valores del hematocrito de 31,4%, y de 32,6% en verano. Considerando los diferentes estados fisiológicos, Macovei y col. (1986), en vacas en distintos meses de gestación y lactación, observaron que, a medida que avanzaba la gestación, los valores de hematocrito iban aumentando. Oltner y Berglund (1983) afirmaron que los valores de hematocrito disminuían en la primera semana post-parto y permanecían estables durante toda la lactación.

### 2.1.8.2.2.- Respuesta humoral

Las L-1 de *Hypoderma* spp. provocan una respuesta humoral dirigida hacia sus secreciones que están constituidas esencialmente por los productos sintetizados por sus glándulas salivales (Boulard y col., 1970).

Durante la migración larvaria se aprecian importantes variaciones individuales en la respuesta humoral del hospedador, atribuibles a la muerte esporádica y más o menos lenta de las larvas; no obstante, en general la curva es ascendente y se repite con cada nuevo ciclo del parásito (Boulard, 1975).

Boulard y Weintraub (1973) estudiaron mediante hemoaglutinación pasiva la respuesta inmunológica en conejos infestados experimentalmente con L-1 de *H. bovis* e *H. lineatum*, poniendo en evidencia un aumento de los niveles de anticuerpos durante los 2 primeros meses postinfestación, con máximos que se mantuvieron hasta el día 200 p.i.; observaron también que la capacidad para estimular la síntesis de anticuerpos por parte de los productos metabólicos de las larvas vivas era mayor que la de los procedentes de larvas muertas. Los anticuerpos inicialmente detectados estaban siempre dirigidos contra la fracción colagenasa de la larva.

La respuesta humoral del hospedador es diferente según se trate de una primoinfestación o de una reinfestación.

En la **primoinfestación** la reacción es más lenta; los anticuerpos circulantes empiezan a detectarse a los 60-90 días post-infestación (Robertson, 1980; Gingrich, 1982 y Baron y Weintraub, 1987a), lo que sugiere que la resistencia adquirida se desarrolla lentamente, o que es objeto de una inmunodepresión. Pruett y Barrett (1985) y Pruett y col. (1987) comenzaron a detectar en el suero, IgG dirigidas contra los antígenos de las L-1 de *H. lineatum* a las 4-6 semanas postinfestación en ganado no infestado previamente.

Independientemente de la edad, los animales infestados por primera vez poseen una cinética de anticuerpos similar, aunque el título máximo de anticuerpos en los más jóvenes es significativamente más elevado que en los mayores (Robertson, 1980). Panadero (1996) y Morrondo (1998) no observaron diferencias significativas respecto a la edad de los animales,

mientras que el número de infestaciones previas de los animales influía considerablemente sobre la intensidad de la respuesta inmune.

En el caso de **reinfestaciones**, Colwell y Baron (1988, 1990) afirmaron que la respuesta anticuerpo comenzaba a detectarse a los 30 días postinfestación y se incrementaba durante 3-4 semanas, coincidiendo con la migración de la larvas hacia el esófago y el canal espinal; durante su permanencia en los campamentos de invierno los niveles de anticuerpos descendieron y permanecieron relativamente bajos hasta que las larvas comenzaron su migración hacia el dorso (25-28 semanas postinfestación). Los anticuerpos alcanzaron el nivel máximo 1-2 semanas antes de la aparición de nódulos en el dorso (37-43 s.p.i.), debido a la liberación más numerosa de enzimas durante la muda larvaria (Boulard, 1969); esta reacción es, sin embargo, de corta duración, se atenúa rápidamente y tiende a finalizar cuando todas las larvas han alcanzado el segundo y tercer estadio. En opinión de Pruett y col. (1987), este descenso del título de anticuerpos es especialmente importante en animales que sufren su primera infestación.

Sinclair y col. (1984), al estudiar la persistencia de los anticuerpos tras la infección con *H. bovis*, observaron que en ganado primoinfectado los anticuerpos comenzaron a decrecer tras la aparición de las larvas en el dorso, siendo sus niveles negativos 14 semanas después de la desaparición de la infección; esto implicó que la presencia de anticuerpos a finales del otoño e invierno se debía a una nueva infestación. No encontraron correlación entre el grado de infección y la persistencia de los anticuerpos. Colwell y Baron (1988, 1990) apuntaron que solo los animales con leves infestaciones (1-4 barros) cesan la producción de anticuerpos cuando se desprenden las últimas larvas, mientras que aquellos con cargas parasitarias altas tienden a mostrar anticuerpos persistentes, incluso durante más de un año.

Barral (2000) y Panadero y col. (2001) estudiaron el perfil de IgM e IgG, así como las subclases IgG1 e IgG2 en bovinos infestados y tratados con ivermectina subcutánea. De esta forma, en los animales control los perfiles de IgG permanecieron constantes durante la infestación, incrementándose durante la migración larvaria. En el caso de la subclase IgG2 este incremento se retrasó dos semanas, coincidiendo con la aparición de los nódulos larvarios en el dorso, lo que se correspondió con el mes de diciembre. Los niveles descendieron significativamente cuando las larvas 3 abandonaban el hospedador, y al acercarse a los meses de mayo-junio, los niveles de estos anticuerpos volvían a incrementarse, probablemente coincidiendo con una nueva infestación. En cuanto a las IgM, los niveles apenas oscilaron a lo

largo del ciclo del parásito. En los animales tratados con ivermectina, las IgG y sus subclases se incrementaron significativamente a las cuatro semanas del tratamiento y posteriormente se redujeron significativamente hasta las 12 semanas. En este grupo de animales, el nivel de anticuerpos también aumentaba al acercarse al final del estudio, coincidiendo con un ciclo nuevo del parásito.

Pruett y Temeyer (1989) demostraron la existencia de **anticuerpos calostrales** anti-hipoderma en vacas infestadas, con el máximo el día del parto, y disminuyendo rápidamente, hasta el punto de que a los 14 días presentan solo el 4,2% del nivel inicial. La persistencia de los anticuerpos calostrales, así como de los séricos de vacas infestadas, es de unos 3-4 meses. A pesar de que los anticuerpos calostrales son activos frente a todas las proteínas larvarias, la mortalidad larvaria en estos animales es muy baja, lo que indica que no poseen un claro efecto protector. La presencia de los anticuerpos maternos puede retrasar la respuesta humoral y celular de los terneros ante una primoinfestación, de modo que no se observan anticuerpos hasta pasados dos meses postinfestación. Martínez-Gómez y col. (1991) también detectaron la presencia de anticuerpos en terneros que no habían tenido ocasión de entrar en contacto con la mosca, sugiriendo la transmisión de anticuerpos anti-hipoderma vía calostrál.

Se ha demostrado que la destrucción de las larvas de *Hypoderma* tras el tratamiento precoz conlleva la liberación del contenido enzimático del intestino medio, lo que provocará una reacción inmune más o menos rápida e intensa, que depende del tipo de insecticida, dosis empleada y vía de administración (Panadero y col., 1997).

Boulard (1975), en bovinos tratados en otoño con dos insecticidas órganofosforados (fentión y niclofolán), comprobó que en el grupo tratado con fentión, en tres días posteriores al tratamiento se produjo un rápido descenso del nivel de anticuerpos, probablemente debido a que las proteínas antigénicas liberadas masivamente por las larvas se unen a los anticuerpos circulantes, sustrayéndolos del plasma; esta disminución se acentuó a los dos meses del tratamiento y posteriormente se estabilizó. En los animales tratados con niclofolán, no se apreció disminución en los títulos de anticuerpos hasta un mes después del tratamiento; el descenso fue lento y se prolongó hasta abril, coincidiendo con las mudas larvarias en el dorso del hospedador.

Boulard (1979) demostró que existía una estrecha relación entre las variaciones del nivel de anticuerpos circulantes tras el tratamiento y las concentraciones de histamina en

sangre. No obstante, observó que, ésta última tenía un papel poco importante en la mediación de los procesos anafilácticos.

En opinión de Francart (1978), la cinética de anticuerpos también depende de los niveles de éstos antes del tratamiento y/o de la carga parasitaria, de modo que cuando los títulos de anticuerpos eran elevados, el descenso era más rápido (aproximadamente 1 mes); por el contrario, si al principio el nivel de anticuerpos era bajo, éste permanecía estable durante unos dos meses; finalmente si los títulos iniciales eran muy bajos, se producía un aumento. Para Francart (op. cit.), los complejos antígeno-anticuerpo que se forman tras un tratamiento temprano de la hipodermosis, están relacionados con el descenso de la respuesta anticuerpo producida en animales muy infestados y tratados con órganofosforados. Estos complejos también están implicados en la reactivación de la producción de anticuerpos, que será mayor si se forman en presencia de una pequeña cantidad de antígenos. Además, este autor señala que la respuesta humoral posterior al tratamiento depende de la pauta de éste, de modo que una sola aplicación en un animal poco parasitado provoca los mismos efectos que un tratamiento fraccionado sobre un bovino intensamente parasitado.

Boulard (1984), en animales a los que se había administrado triclorfón, detectó variaciones en los niveles de anticuerpos entre las 2 y las 4 horas p.t. Asimismo, comprobó que, en animales a los que se había administrado oral y tópicamente distintas dosis del piretroide decametrin, la cinética de los anticuerpos circulantes variaba en función de la dosis y de la vía de administración.

Como ya se ha señalado anteriormente, la evolución de los anticuerpos varía con la composición del antiparasitario empleado. Así, tras la administración de órganofosforados los anticuerpos circulantes disminuyen en las horas y días posteriores al tratamiento, mientras que después de la administración de ivermectina, el descenso de los títulos de anticuerpos se observa una semana después (Colwell y col., 2003). Asimismo, Prieto y col. (1990) detectaron, 5 meses después del tratamiento con 0,2 mg/Kg p.v. de ivermectina, una disminución en los títulos de anticuerpos, hasta llegar a niveles próximos a la negatividad; por el contrario, los animales infestados y no tratados tenían absorbancias elevadas. Sin embargo, 7 meses después del tratamiento, los niveles de anticuerpos de ambos grupos (tratados y no tratados) eran prácticamente negativos.

Panadero y col. (1997) determinaron el efecto sobre la cinética de anticuerpos en bovinos infestados naturalmente por *H. lineatum* e *H. bovis*, tras un tratamiento precoz con ivermectina y doramectina (0,2 mg/kg p.v. para ambas). Los niveles de anticuerpos comenzaron a descender 1 mes post-tratamiento en el grupo tratado con ivermectina, mientras que en el de la doramectina, descendían 2 semanas más tarde. No obstante, en ambos grupos, el descenso fue muy significativo a las 21 semanas post-tratamiento, aunque posteriormente disminuyeron más lentamente, y todavía persistían en la semana 28 p.t. Además, en la semana 12 p.t. los animales tratados con ambos antiparasitarios mostraban títulos bajos de anticuerpos debido a la eliminación de las larvas muertas, mientras que en los testigos continuaban elevados pues ese periodo coincidió con la llegada de las larvas al dorso.

Lonneux y Losson (1994) en bovinos tratados con moxidectina tópica al 0,5%, comprobaron que los títulos de anticuerpos comenzaban a descender al mes del tratamiento. Al comparar los niveles de anticuerpos de los animales tratados y de los testigos, observaron que las diferencias entre los dos grupos se incrementaban a partir del día 27 p.t.

Boulard y col. (1998) evaluaron la actividad de la moxidectina al 1% (0,2 mg/kg p.v.) en solución inyectable frente a las L-1 en terneros infectados de forma natural. Los niveles de anticuerpos mostraron una evolución paralela en el grupo de los tratados y de los testigos después de 1 mes post-tratamiento; posteriormente, observaron que en los primeros descendían progresivamente durante 8 semanas, mientras que en los testigos se mantuvieron estables. La cinética de anticuerpos fue similar a la observada por Lonneux y Losson (1994) con moxidectina tópica y sugiere una acción progresiva de estos fármacos, pues el descenso de los títulos de anticuerpos se produjo gradualmente, probablemente debido a la liberación más lenta de los antígenos larvarios; posiblemente, también se reduciría el riesgo de efectos secundarios con un tratamiento tardío realizado en otoño.

Colwell y col. (1997) examinaron el efecto del tratamiento con distintas avermectinas y milbemicinas sobre los niveles y persistencia de anticuerpos anti-*Hypoderma*; concluyeron que las encuestas serológicas realizadas en otoño no deberían verse influidas por un tratamiento a base de avermectinas/milbemicinas, pues los anticuerpos se detectan al menos durante 6 semanas p.t. Por otra parte, la administración de un tratamiento precoz

podría interferir en el desarrollo de resistencia frente a futuras infestaciones, al interrumpirse muy pronto el estímulo antigénico.

## 2.2.- LAS CITOQUINAS COMO FACTORES REGULADORES DE LAS INFECCIONES PARASITARIAS

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas en respuesta a un estímulo (Imagen 7). Su secreción se produce de modo rápido y autolimitado y normalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, aunque en ciertos casos pueden incrementarse notablemente los niveles como respuesta a determinadas agresiones. De igual forma que otros compuestos peptídicos, las citoquinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, lo que explica que se necesiten cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico (Abbas y col., 2002). Es también muy habitual que la misma citoquina tenga diversas acciones al actuar sobre diferentes células (pleiotropismo), así como que haya acciones redundantes entre diferentes citoquinas, sobre todo *in vitro*. El pleiotropismo puede explicarse por la existencia de receptores para una misma citoquina en células diferentes y/o por la existencia de diferentes cascadas de señalización intracelular. La redundancia se puede justificar, al menos en parte, por la existencia de receptores o vías de señalización compartidos por diferentes citoquinas (Ozaki y Leonard, 2002). Por último, como consecuencia de toda esta variedad en la señalización, es muy habitual encontrar casos de antagonismo (inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos) o sinergismo (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente) entre diferentes citoquinas.

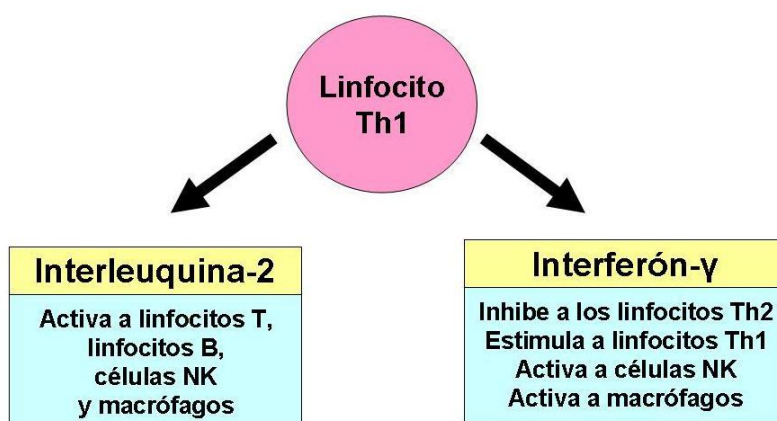
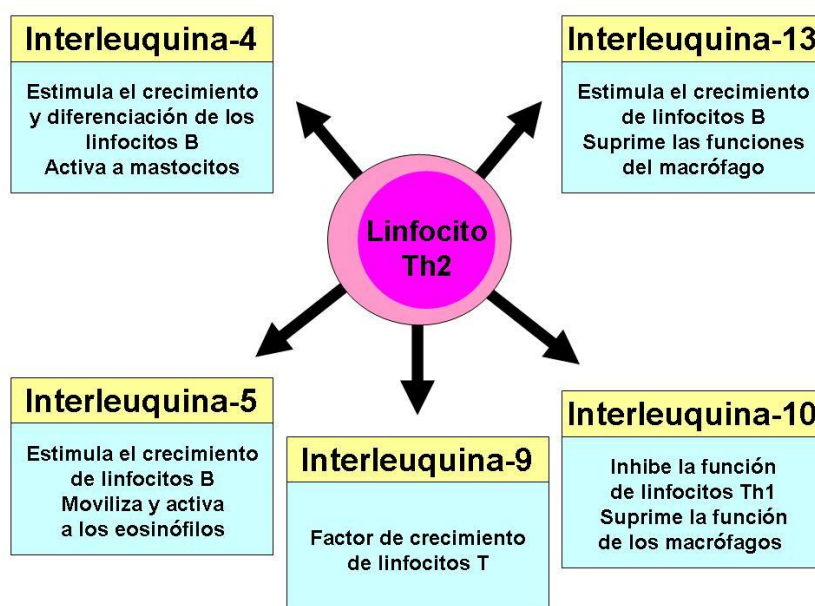


Imagen 7.- Citoquinas producidas por los linfocitos Th1 y sus principales acciones (Tomado de Tizard, 2009)



La células Th (células T "helper") evolucionan hacia dos subpoblaciones: de un lado las células Th1 están vinculadas con los procesos inflamatorios, la activación de macrófagos y la sensibilidad retardada, elaboran IL-2 e IL-3, interferón gamma, factor de necrosis tumoral, GM-CSF y linfoxina. Por otra parte las células Th2 ayudan a las células B a sintetizar anticuerpos y secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Imagen 8). La IL-10 es secretada por ambas subpoblaciones en humanos. Se sabe que la interacción temprana del antígeno con los macrófagos o células dendríticas que producen IL-12 o con las que secretan IL-4, desvía la respuesta hacia Th1 ó Th2, respectivamente. Las respuestas Th1 son eficaces ante infecciones intracelulares virales y microorganismos que se multiplican en macrófagos, mientras que las Th2 son buenas colaboradoras de las células B y parecen estar adaptadas para la defensa contra los parásitos que son vulnerables a IgE. No obstante, el paradigma Th1/Th2 postulado por Mosmann y col. (1986) en un modelo murino, no está tan bien definido en el ganado vacuno, donde la mayor parte de los estudios indican una respuesta de tipo mixto o Th0 (Estes y Brown, 2002). Por otra parte, quizá lo más conveniente sea no ceñirse al paradigma Th1/Th2, puesto que la polarización de la respuesta inmune es algo dinámico que puede variar con las distintas fases de desarrollo del parásito en el hospedador.



**Imagen 8.- Citoquinas producidas por los linfocitos Th2 y sus principales acciones (Tomado de Tizard, 2009)**

La **interleuquina 12** se definió originalmente como un activador de la función citolítica de las células NK producido por los macrófagos, aunque actualmente se sabe que es un potente inductor de la producción de IFN- $\gamma$ , tanto por las células T como por las células NK. La IL-12 actúa como un factor de diferenciación para las células T CD4<sup>+</sup>, favoreciendo su especialización en células tipo Th 1 productoras de IFN- $\gamma$ , que ayudan en la inmunidad mediada por los fagocitos. Esta interleuquina aumenta la función citolítica de las células NK activadas y de las células T CD8<sup>+</sup>. Al mismo tiempo, la IL-12 proporciona una importante conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, favoreciendo el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas que pueden proteger mejor al hospedador frente a agentes extraños (Abbas y col., 2002).

La **interleuquina-10** es una citoquina producida por macrófagos activados, algunos linfocitos y otros tipos celulares no linfocitarios (queratinocitos). Las dos principales actividades de la IL-10 son inhibir la producción de citoquinas por los macrófagos y las funciones accesorias de éstos en la activación de las células T. La IL-10 en el macrófago da lugar a una disminución de la expresión del CMH II, reduce la endocitosis e inhibe la producción de las citoquinas proinflamatorias y la generación de NO. El efecto más directo de estas acciones es inhibir la respuesta inmunitaria innata y la específica mediada por células T (Mosmann, 1994)

La **interleuquina 4** se identificó inicialmente como una citoquina producida por las células T colaboradoras que estimulaba la proliferación de las células B, así como la expresión de las moléculas CMH de tipo II. Actualmente se sabe que su función principal es regular las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y por los mastocitos/eosinófilos. La IgE es la mediadora fundamental de las reacciones de hipersensibilidad inmediata, y se cree que el aumento de la concentración de IL-4 es favorable para el desarrollo de alergias. Los anticuerpos IgE desempeñan también un papel importante en la defensa frente a las infecciones por artrópodos y helmintos.

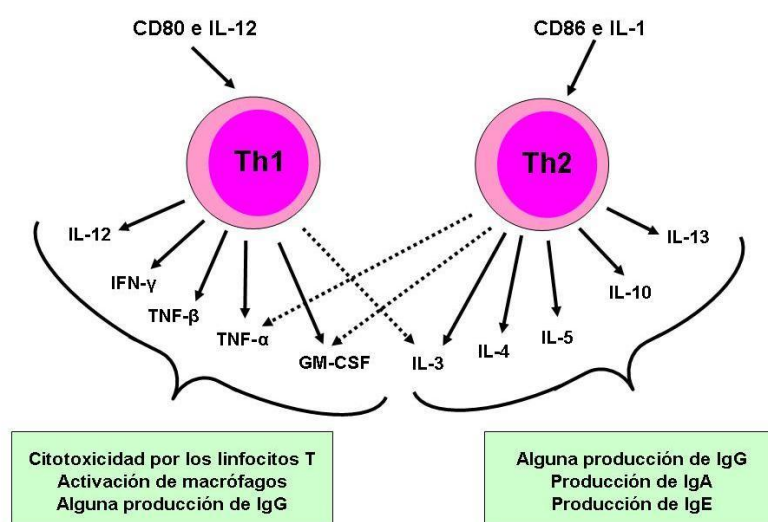
Las principales fuentes celulares de IL-4 son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y en concreto la subpoblación Th2. Los mastocitos y basófilos activados, al igual que algunas células T CD8<sup>+</sup>, son capaces igualmente de producir IL-4. La IL-4 es un factor de crecimiento y diferenciación para las células T, en particular para las Th2, es decir, favorece el desarrollo de células Th2 a partir de las células T vírgenes estimuladas por el antígeno; asimismo, interviene como un factor de crecimiento autocrino para las células Th2 diferenciadas,

favoreciendo posteriormente la expansión de esta subpoblación (Abbas y col., 2002). Asimismo, regula la expresión y secreción de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  lo que inhibe la respuesta Th1.

El **interferón- $\gamma$** , también llamado interferón tipo II o inmunitario es generado por las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activadas y por las células NK. El inicio de la transcripción es consecuencia de la activación antigénica y aumenta por acción de la IL-2 y la IL-12. Es un potente activador de los fagocitos mononucleares, el principal factor activador de los macrófagos y además contribuye a que las células T activen éstos. Aumenta la expresión de moléculas CMH de tipo I y II en una gran variedad de tipos celulares. De esta manera, amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmunitaria favoreciendo la activación de las células T CD4<sup>+</sup> colaboradoras. Actúa sobre los linfocitos T favoreciendo su diferenciación desde células T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia la subpoblación Th1 e inhibe la proliferación de las células Th2. No obstante, es una citoquina necesaria para la maduración de los CD8<sup>+</sup>. En los ratones, se comprobó que actúa sobre las células B favoreciendo la síntesis de las subclases IgG2a e IgG3 y la inhibición de la producción de IgG1 e IgE. De esta forma, el IFN- $\gamma$  induce una respuesta humoral que también participa en la eliminación de agentes extraños. Activa los neutrófilos aumentando su metabolismo oxidativo y estimula la actividad citolítica de las células NK. Es un activador de las células endoteliales vasculares, favoreciendo la adhesión de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las alteraciones morfológicas que facilitan la extravasación de éstos. El IFN- $\gamma$  también potencia muchas de las acciones del TNF- $\alpha$  sobre las células endoteliales. Finalmente, bloquea los efectos proliferativos de la IL-4 sobre las células Th2, previniendo la expresión de esta subpoblación de células T (Suk y col., 1993). El efecto directo de estas diferentes actividades es favorecer reacciones inflamatorias ricas en macrófagos, al tiempo que inhibe reacciones dependientes de IgE.

El **factor de necrosis tumoral- $\alpha$**  es el mediador principal de la respuesta frente a las bacterias gram-negativas y también puede desempeñar un importante papel en otras respuestas inmunitarias. La principal fuente celular del TNF- $\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados por el lipopolisacárido de bacterias gram-negativas, aunque también puede ser secretado por las células T estimuladas por un antígeno, células NK y mastocitos activados. De esta manera, el TNF- $\alpha$  actúa como mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, y es un importante nexo de unión entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda. Entre sus acciones destacan las siguientes: el TNF- $\alpha$  hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de

superficie que facilitan a los leucocitos su adhesión a la superficie de la célula endotelial, inicialmente a los neutrófilos, y posteriormente, los monocitos y linfocitos. Estas acciones propician el acúmulo de leucocitos en los focos inflamatorios y los activan para que destruyan agentes extraños. El TNF- $\alpha$  es especialmente potente para activar los neutrófilos, pero también estimula a eosinófilos y fagocitos mononucleares. La producción prolongada de concentraciones bajas de TNF- $\alpha$  da lugar a la regeneración tisular, ya que actúa como un factor de angiogénesis, induciendo la formación de nuevos vasos, y también supone un factor de crecimiento para los fibroblastos, induciendo depósito de tejido conectivo. Estos efectos del TNF- $\alpha$  son importantes en las respuestas inflamatorias locales contra agentes extraños. Si las concentraciones de esta citoquina son muy bajas, como ocurre en animales tratados con anticuerpos neutralizantes anti-TNF o en ratones con inhibición genética de TNF- $\alpha$ , se puede producir un fallo defensivo del organismo (Fong y Mosmann, 1990).



**Imagen 9.-Diferencias esenciales entre los linfocitos Th1 y Th2 (Tomado de Tizard, 2009).**

Son numerosos los trabajos que estudian el papel de las interleuquinas en el desarrollo de distintas parasitosis (Imagen 9); sin embargo, son escasos los trabajos realizados respecto a las artropodosis y gran parte de ellos hacen referencia a la infestación por garrapatas. Los estudios han demostrado que las secreciones salivales inoculadas por las garrapatas incrementan la producción de las citoquinas Th2, al tiempo que inhiben las asociadas a la respuesta de tipo Th1 (Ferreira y Silva, 1998; Kovář y col., 2002). Kopecky y col. (1999) evaluaron el efecto de un componente antigénico de la saliva (SGE) de *Ixodes*

*ricinus* sobre la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-10, comprobando que el SGE inyectado a ratones disminuía notablemente la secreción de IFN- $\gamma$  en cultivos de células de bazo, pero aumentaba la secreción de IL-10 lo que podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de las secreciones salivales de la garrapata.

Ferreira y Silva (1998), en un estudio para comprobar el efecto de las diferentes citoquinas en la infestación por garrapatas en ratones, comprobaron que las células linfáticas, cultivadas en presencia del mitógeno Con A, expresaban un perfil Th2, representado por la secreción aumentada de IL-4 e IL-10. Por el contrario, la IL-2, el IFN- $\gamma$  y la IL-12 se inhibían de forma significativa. Estos hallazgos indican que las secreciones salivales de las garrapatas podrían modular la respuesta inmunitaria del hospedador hacia una respuesta tipo 2.

En ganado vacuno, Ramachandra y Wikel (1995) demostraron que los extractos salivales de *Dermacentor andersoni* inhiben la síntesis de IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por los macrófagos. Hay que destacar que en las infestaciones por garrapatas la IL-10 interfiere en la maduración funcional de las células dendríticas (De Smedt y col., 1997). En los ganglios linfáticos de ratones parasitados por garrapatas, D' Andrea y col. (1993) observaron una reducción de la IL-12 debida probablemente debida a la importante producción de IL-10 e IL-4. De esta forma la IL-10 junto con la IL-4, suprimiría la síntesis de IL-12.

En la miasis provocada por *Lucilia sericata*, Elhay y col. (1994) detectaron a nivel dérmico un aumento de la expresión de las citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-2 e IFN- $\gamma$  junto con una intensa infiltración de granulocitos, células T y macrófagos. Por otra parte, el papel de la respuesta inmune para determinar la resistencia o receptividad a la infección por *Lucilia* en ovino se considera de vital importancia en la selección de animales genéticamente resistentes. Así mismo, observaron que las proporciones de IFN- $\gamma$  aumentaron ligeramente en los animales primoinfectados a las 100 h.p.i, mientras que, en infecciones secundarias todas las ovejas demostraron mayor aumento del IFN- $\gamma$  a las 72 horas. En cuanto a la expresión de las citoquinas a nivel dérmico, las IL-6 y 8 aumentaban rápidamente a las 6 h.p.i., manteniéndose durante las siguientes 48 horas, pero no observaron este aumento en el caso del TNF- $\alpha$ . Otras citoquinas como la IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 también se detectaron a las 6 h.p.i. Cabe destacar la ausencia de IL-4 en todos los animales. Bowles y col. (1994) encontraron un aumento del IFN- $\gamma$  e IL-2 tras la primoinfección por *Lucilia cuprina*, que fue mayor en las ovejas reinfestadas.

En relación con otras parasitosis, Alves y col. (2008) observaron que los animales asintomáticos infectados por *Leishmania* presentaban el mayor nivel de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo cual indicaba que estas dos citoquinas desempeñaban un papel importante en la protección contra la infección. Por el contrario, la expresión de la IL-10 fue superior en los animales que manifestaban síntomas clínicos.

En cuanto a la infección por *Toxoplasma*, Thouvenin y col. (1997) demostraron en cultivos de células esplénicas de ratas gestantes e infectadas con *T. gondii* que el nivel de IFN- $\gamma$  y de óxido nítrico era elevado con respecto a ratas no gestantes, mientras que la respuesta Th2 era menor. Del mismo modo, Abou-Bacar y col. (2004) apreciaron que la inmunidad protectora en ratones infectados con *T. gondii* estaba mediada principalmente por citoquinas secretadas en la respuesta Th1 y, de forma especial, por el IFN- $\gamma$ . Rozenfield y col. (2005) observaron que el IFN- $\gamma$  era la principal citoquina implicada en la defensa inmunológica frente a este parásito.

Con respecto a los protozoos hemáticos, Goff y col. (2003) demostraron la importancia del IFN- $\gamma$  en la respuesta Th1 durante la infección por *Babesia bovis* en terneros y comprobaron que el óxido nítrico secretado por los monocitos bovinos expuestos a merozoitos de *B. bovis* poseía un efecto babesicida. Del mismo modo, Zintl y col. (2005) también observaron que las infecciones por *Babesia bovis* parecen estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Así, observaron en terneros infectados con este parásito una respuesta temprana caracterizada por la secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en las células esplénicas. Posteriormente, estos animales ya no mostraban una reacción tipo Th1, con niveles de IL-10 que se mantenían durante un periodo prolongado de tiempo. En cuanto a *Plasmodium* spp., Patterson y col. (1999) comprobaron que una respuesta prolongada del IFN- $\gamma$  se asociaba a un aumento de la supervivencia de los ratones infectados.

En general, se ha visto que las infecciones intestinales con helmintos dirigen la respuesta inmune hacia un perfil de citoquinas de tipo 2, que conlleva la producción de IgE, activación de mastocitos y secreción de mucus que contribuyen a la eliminación del parásito (Grencis, 1997).

Helmby y Grencis (2003) en ratones infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* observaron que la expulsión de adultos del intestino se asociaba con una

mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th2 que se manifestaba con una abundante secreción de las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13. De esta manera la respuesta Th2 es responsable de la inmunidad protectora para muchos nematodos intestinales, incluyendo a *T. spiralis*.

Johnson y col. (2005) observaron en el curso de una infección primaria por *Dictyocaulus viviparus* un perfil mixto de citoquinas que lleva a la eliminación de los parásitos en aproximadamente un mes, lo que coincide con otros trabajos en los que se pone en duda la necesidad de la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 para la protección del ganado vacuno frente a los nematodos.

En la infección por *Toxocara canis*, Torina y col. (2005) observaron que la concentración de IL-10 aumentaba durante la gestación mientras que la concentración de IFN- $\gamma$  disminuía. Tras el parto, en los cachorros, la concentración de IL-10 disminuía con la edad mientras que la de IFN- $\gamma$  aumentaba. Pecinali y col. (2005) establecieron una estrecha correlación entre las lesiones tisulares causadas por la migración larvaria de *Toxocara canis* en ratones infectados experimentalmente y el incremento en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias y las que tienen un efecto quimiotáctico sobre los eosinófilos.

En lo que respecta a las trematodosis, Poitou y col. (1993) observaron que durante la infección por *Fasciola hepatica* tenía lugar una respuesta linfocitaria Th1, que era reemplazada por otra Th2 que parecía más orientada hacia un mecanismo de tolerancia por parte del hospedador que a un fenómeno de protección y eliminación de la infección. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que se pueden producir respuestas “intermedias”, y aparecer clones de linfocitos Th1, Th2 y Th0 (producen IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ). Clery y col. (1996) comprobaron en terneros con fasciolosis crónica natural y en terneros re infectados experimentalmente que no se detectaba IFN- $\gamma$  y concluyeron que, puesto que la infección se había establecido con éxito, se trataba de una respuesta linfocitaria no protectora de tipo Th2. Además, Poitou y col. (1993) y Clery y col. (1996) señalaron que en el caso de fasciolosis crónicas, el hospedador limita su respuesta inmune con objeto de reducir las lesiones tisulares y limitar la extensión de la infección mediante una respuesta de tipo Th2.

Gironés y col. (2007) en una infección experimental con *Fasciola hepatica* en ratas, comprobaron que en las semanas 7, 10 y 20 había un predominio de las citoquinas Th2 con

respecto a las citoquinas de tipo Th1. Estos autores no detectaron diferencia significativa en la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  al compararlo con las ratas sin infectar; sin embargo, los niveles de IL-1, IL-10 e IL-4 a las 7 semanas después de la infección eran más altos en las ratas parasitadas que en las testigo. Posteriormente, a las 10 y 20 semanas observaron una disminución de la IL-10 e IL-4 y en la semana 20 no encontraron ninguna diferencia en la secreción de las diferentes interleuquinas estudiadas. Tampoco encontraron correlación entre el número de adultos en hígado y la producción de citoquinas a lo largo del estudio. No obstante, observaron una correlación negativa entre el nivel de IL-4 y la eliminación de huevos a las 7 y 10 semanas post-infección.

Chevillard y col. (2003) comprobaron que la producción de productos de excreción-secreción de *Schistosoma mansoni* estaba regulado por diferentes citoquinas, entre las cuales estaba el IFN- $\gamma$ . También vieron que niveles altos de IFN- $\gamma$  se relacionaban con una reducción notable del riesgo de fibrosis hepática. Por otra parte la cinética del IFN- $\gamma$  y de la IL-10 mostraba que la respuesta protectora estaba regulada por las citoquinas tipo Th1 en fases tempranas de la infección. Sher y Coffman (1992) afirmaron que la IL-10 e IFN- $\gamma$  jugaban un papel fundamental en el inicio de la infección por *Schistosoma* y posteriormente se sustituía por una respuesta no protectora de tipo Th2.

Boros y Whitfield (1998) estudiaron la formación del granuloma inflamatorio en ratones infectados por *Schistosoma mansoni*, demostrando que la IL-10 era un potente regulador de la respuesta inflamatoria que promueve la formación del granuloma.



## 2.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO LAMINAR

### 2.3.1.- FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica basada en la detección de inmunofluorescencia que presenta numerosas ventajas respecto de otras técnicas basadas en el mismo principio:

- Permite el análisis de un elevado número de partículas en un corto periodo de tiempo (5000 partículas/segundo).
- Permite analizar poblaciones celulares y epítomos celulares.
- Posibilita el análisis, tanto funcional como cinético, de las células en tiempo real.
- Se pueden cuantificar las moléculas antigénicas basándose en los niveles medios de fluorescencia.
- Presenta una elevada sensibilidad y especificidad, que le permiten detectar y caracterizar poblaciones celulares residuales o poco abundantes en condiciones normales.
- Los datos obtenidos se pueden almacenar en un soporte informático para poder disponer de ellos en cualquier momento
- Cuantifica las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.

Esta tecnología, en un principio sofisticada y restringida a laboratorios de investigación básica, ha pasado a estar presente en los últimos años en el trabajo cotidiano de muchos laboratorios clínicos. Los primeros modelos de citómetro de flujo los desarrollaron Moldovan Kielland, en la década de los 30, con el objetivo de contar partículas. Fue en los 40-50 cuando se incorporó a los citómetros la capacidad de medir la célula. En los años 60 se produjo la verdadera revolución cuando se incorporó la posibilidad de medir varios parámetros de la célula al mismo tiempo. A partir de aquí se empiezan a incorporar a los citómetros todos aquellos equipos de medición que en la actualidad presentan. En los años 80 y 90 no se han producido grandes transformaciones en estos equipos sino que el desarrollo ha ido encaminado a encontrar otras nuevas aplicaciones.

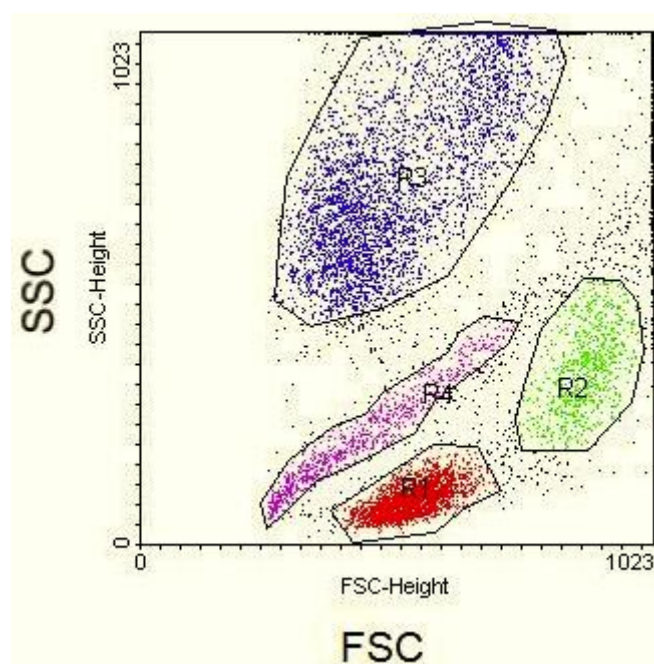
El citómetro de flujo consta, básicamente, de una fuente de luz, un sistema de flujo celular, unos componentes ópticos para diferenciar y seleccionar las modificaciones de la luz, los elementos electrónicos para amplificar y procesar la señal resultante y un ordenador. Las propiedades celulares medidas en el citómetro se basan en dos principios: dispersión de la luz y fluorescencia.

La dispersión de la luz se basa en el principio físico consistente en que cuando un haz de luz choca contra una célula cambia la dirección de la luz pero no su longitud de onda. Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño celular, el núcleo, la membrana celular y el material granular del interior. También la forma de la célula y si la superficie es lisa o rugosa. La luz no se dispersa igual en todas direcciones y la mayoría se proyecta hacia adelante. La luz dispersada hacia adelante ("forward scatter", FSC) es una medición del tamaño celular, mientras que la luz dispersada en ángulo recto ("side scatter", SSC) depende de la densidad celular y la granulosidad y no del tamaño (Orfao y González de Buitrago, 1995). La fluorescencia se caracteriza porque los compuestos fluorescentes absorben energía luminosa de longitud de onda característica para cada compuesto. Esta absorción hace que suba un electrón a un nivel energético superior. El electrón excitado cae rápidamente al estado normal emitiendo un fotón y desprendiendo energía. Como fuente de luz son utilizados los rayos láseres, generalmente de argón. La ventaja que tienen los láseres es, que utilizan una luz monocromática con un diámetro de haz relativamente pequeño.

El rayo láser de argón se halla ajustado a una longitud de onda de 488 nm (luz azul); sin embargo, también se utilizan láseres con luz verde a longitudes de onda de 515 y 535 nm. Normalmente los citómetros poseen cinco sistemas ópticos de medidas: dos de dispersión, uno hacia adelante y otro en ángulo recto, y tres de fluorescencia. El sistema de dispersión hacia adelante determina el tamaño de las células. La luz correspondiente a las diferentes emisiones fluorescentes se recoge en ángulos cercanos a los 90° junto con la luz dispersada lateralmente. Por ello se hace necesario un sistema óptico que permita separar la luz que, aunque recogida lateralmente, aporta información diferente sobre las características de cada célula, la complejidad de la célula y cada una de las emisiones fluorescentes correspondientes a cada uno de los fluorocromos presentes en la célula y excitados del mismo modo. Esta propiedad, quizás una de las más importantes del citómetro de flujo, permite utilizar de forma simultánea diferentes fluorocromos.

El uso de compuestos fluorescentes, denominados fluorocromos, en citometría de flujo ha sido fundamental en el desarrollo de esta técnica. Se debe tener en cuenta que cuando se utilizan varios fluorocromos los espectros de emisión deben tener un solapamiento mínimo con objeto de que puedan cuantificarse de forma separada (Harrison y Vickers, 1990). El primer fluorocromo que se utilizó para el marcaje fue el FITC, que es una molécula pequeña, con una importante afinidad a las proteínas.

La adquisición celular es la visualización en tiempo real y por medio de citogramas (Imagen 10) de los parámetros de dispersión y fluorescencia que presentan las células de la muestra a analizar, y que pueden ser almacenados para su posterior análisis. Para ello, gracias al sistema de inyección de muestra se hacen pasar las células por un haz de luz para su posterior procesamiento informático y presentación de los citogramas en pantalla. Durante la adquisición se puede realizar una discriminación de células por medio de regiones de exclusión llamadas "life a gate" o "ventanas". De esta manera se adquirirá, analizará o simplemente visualizará el comportamiento físico y antigénico de la población seleccionada.



**Imagen 10.- Citograma en el que se observan distintas poblaciones celulares.**

Los citogramas usados habitualmente tanto en la adquisición celular como en su análisis se presentan sobre un eje de coordenadas X/Y. Las poblaciones celulares,

representadas por agrupaciones homogéneas de puntos, se situarán en los citogramas dependiendo de sus características físicas de dispersión (SSC/FSC) y antigénicas.

Existen programas informáticos que proporcionan entre otros parámetros el número de células adquiridas, el número de células que se están adquiriendo por segundo, el número de células adquiridas dentro de una determinada ventana, su porcentaje en cuanto al total de células adquiridas, etc. Además permite decidir de antemano el número de células que deseamos adquirir en total y en la ventana de adquisición, deteniéndose esta adquisición al llegar a estas cifras.

En los citogramas de dispersión las células se colocan en relación a su tamaño (FSC) y a la complejidad de su núcleo y citoplasma (SSC). Si en un citograma de dispersión X corresponde a FSC (tamaño), las células colocadas más a la derecha serán más grandes y las situadas a la izquierda más pequeñas. Si Y corresponde a SSC (complejidad) las células situadas mas arriba serán las mas complejas y las situadas mas abajo serán las menos complejas. Es decir, a mayor X y mayor Y células más grandes y complejas, y a menor X y menor Y células más pequeñas y menos complejas.

En los citogramas de dispersión de la serie blanca quedan representadas las células de una muestra después de lisar su serie roja anucleada. La lectura de la señal se realiza en forma lineal y en ella quedan representadas a modo de poblaciones celulares, los linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos, además de alguna población anormal de blastos, células plasmáticas y otras células no presentes normalmente en la muestra (dobletes, células apoptóticas, células necróticas). Los basófilos, aunque son más complejos que las células anteriormente citadas, debido a la composición química de sus gránulos, no dispersan la luz y se sitúan en la zona más compleja y grande de la zona de linfocitos. En forma de ruido o falsas poblaciones aparecen los restos celulares de los hematíes, de las plaquetas y la suciedad o *debrise*. La solución lisante solamente lisa los hematíes anucleados (eritrocitos y reticulocitos). Los hematíes nucleados no son lisados. Esto explica que la serie roja inmadura normal en una médula ósea no sea lisada, situándose en parte de la zona ocupada por los linfocitos en cuanto a tamaño y complejidad en una muestra de sangre periférica. También puede ser erróneo el número de linfocitos si seleccionamos estos por tamaño y complejidad cuando existe una basofilia importante debido a la situación de los basófilos en un citograma SSC/FSC.

### 2.3.2.- APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

Mediante anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos se pueden identificar diversos antígenos, que permiten la caracterización y clasificación de diferentes células tanto normales como patológicas. El isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina y el PerCP son los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488 nm (luz azul) y emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente. El citómetro mediante una compensación electrónica permite su utilización simultánea. Así, la monitorización de las subpoblaciones linfocitarias, fundamentalmente la cuantificación en sangre periférica de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, en numerosas patologías aporta un valor diagnóstico y pronóstico.

Los clúster de diferenciación son moléculas marcadoras en la superficie celular, que reconocen ciertos anticuerpos, y que se usan para la identificación del tipo de célula, estadio de diferenciación celular y actividad de la misma. Son un sistema de antígenos de superficie celular de los leucocitos, que se caracterizan mediante anticuerpos monoclonales, permitiendo la categorización de los leucocitos y otras células hematopoyéticas.

Durante su maduración y diferenciación, los linfocitos inmaduros van recibiendo en su superficie una serie de receptores inmunológicos los cuales van apareciendo a modo secuencial conforme progresa la maduración y luego la diferenciación de los linfocitos. Se les denomina marcadores de diferenciación pues le dan a la célula linfocítica componentes fenotípicos únicos del estadio de diferenciación en que estén.

La **CD2** es una glucoproteína de 50 kDa, de la familia de las inmunoglobulinas. Su acción consiste en la mediación en la adhesión de las células T activadas y los timocitos con las células presentadoras de antígenos y las células diana. Es un marcador de todas las células T y aparece tempranamente durante la maduración de los linfocitos en el timo. En su función como correceptores de la membrana del linfocito T, un CD2 incrementa la estabilidad de la interacción entre la célula T4 y la célula presentadora de antígeno (APC) respectiva actuando como receptor para la molécula LFA-3 (CD58) en la membrana del APC.

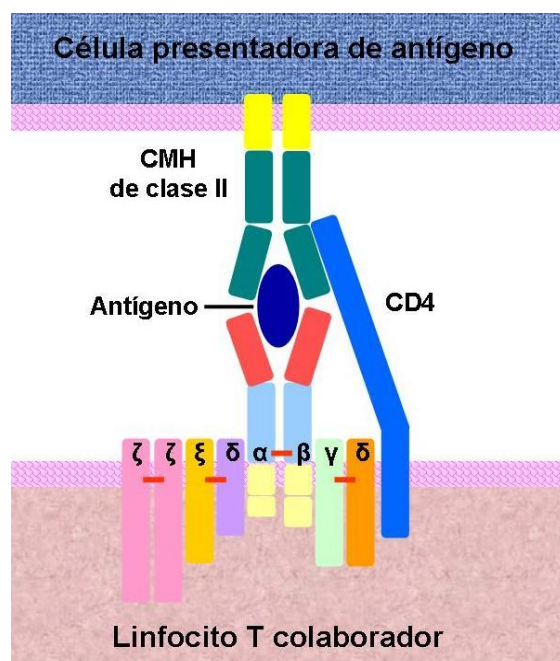
Ésta y otras moléculas tienen función coestimuladora y su interacción con sus receptores o ligandos determinará si el linfocito T responderá frente a los antígenos presentados por las células presentadoras del antígeno.

Durante la interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito T, la unión del CD2 con su ligando LFA-3 (CD58) estimula la producción de interleuquina-1.

Esta proteína se expresa en la superficie de los linfocitos T (CD2<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) y en una subpoblación de linfocitos NK (CD2<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>). No todos los linfocitos NK expresan CD2. La expresión de CD2 es más intensa en los linfocitos T que en los linfocitos NK.

Al estudiar el porcentaje de linfocitos T CD2<sup>+</sup> en ganado vacuno sano, Park y col. (1992) comprobaron que en vacas adultas, durante la lactación, el porcentaje de estos linfocitos variaba entre el 45,2% y el 52,5%. Asimismo, Davis y col. (1988) en otro estudio similar describieron como normal, en bovinos adultos sanos, porcentajes de linfocitos T CD2<sup>+</sup> en sangre periférica del 46% al 75%.

El **CD4** es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas. Es una glucoproteína monomérica de 59 kDa de peso que contiene cuatro dominios (D1, D2, D3, D4) del tipo de las inmunoglobulinas. Participa en la adhesión de las células T a las células diana (Imagen 11). Asimismo está implicado en la maduración tímica y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA II. Confiere al linfocito la función colaboradora o helper. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen el antígeno asociado al CMH II, y por ello se refiere a ellos como restringidos a CMH de clase II.



**Imagen 11.- Participación del marcador CD4 en la adhesión del linfocito a la célula presentadora de antígeno (Tomado de Tizard, 2009).**

La respuesta a antígenos solubles o células autólogas provoca la proliferación de los linfocitos T, siendo ésta una señal adecuada para la proliferación y diferenciación de las células B en células secretoras de inmunoglobulinas.

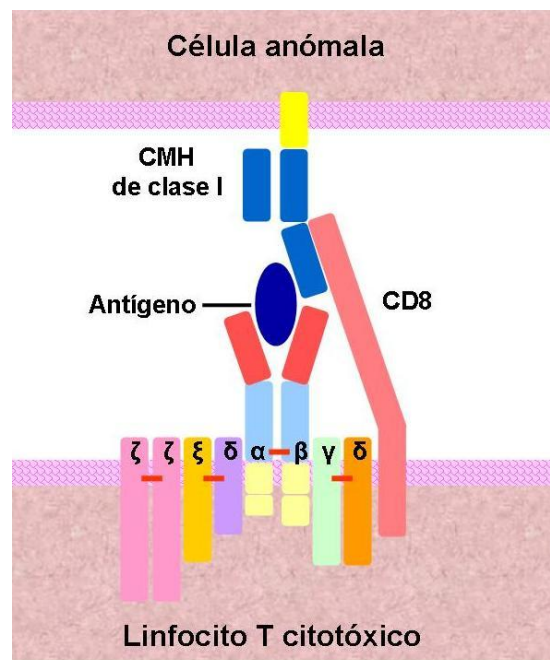
Esta proteína de membrana se expresa en los linfocitos T helper y en el 80-95% de los timocitos (coexpresando CD8). Con menos intensidad aparece en los monocitos, en los eosinófilos y en el citoplasma de los macrófagos. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> expresan CD3 y los monocitos y macrófagos no expresan CD3. La expresión de CD45Ra por parte de los linfocitos CD4<sup>+</sup> se puede interpretar como linfocitos vírgenes y su expresión de CD45Ro como linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria.

Se han llevado a cabo diversos estudios en vacas de raza Frisona para determinar el porcentaje normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Así Park y col. (1992) observaron un porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en animales adultos que variaba entre el 25,0% y el 31,5% a lo largo de la lactación. Por otra parte, según Baldwin y col. (1986), el porcentaje normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica de animales adultos oscila entre el 23% y el 35%. Sopp y Howard (2001) determinaron como fisiológico un porcentaje del 37,7% de linfocitos T circulantes que presentan en su superficie el receptor CD4.

En ganglios linfáticos bronquiales Sopp y Howard (2001) determinaron como fisiológico un porcentaje del 24,3% de todos los linfocitos T que expresaban en su superficie la glicoproteína CD4.

El **CD8** es una molécula que se expresa en la superficie de algunos linfocitos T, conocidos como citotóxicos. Es una glucoproteína dimérica de 65-70 kDa que cruza la membrana y participa como correceptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos T a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I. Esta proteína también está implicada en la maduración tímica de los linfocitos T y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos asociados a moléculas de clase I y por ello se refiere a ellos como restringidos a CMH de clase I (Imagen 12).

Se expresa en los linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) y en una subpoblación de linfocitos NK (CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>). Es también expresado por la mayoría de los timocitos coexpresando CD4 (Abbas y col., 2002).



**Imagen 12.- Participación del marcador CD8 en la adhesión del linfocito a la célula presentadora de antígeno (Tomado de Tizard, 2009).**



Diversos autores realizaron estudios encaminados a determinar los valores normales de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de bovinos adultos. Según Park y col. (1992), los valores normales de estos linfocitos T, en animales adultos de raza Frisona, varían entre el 16,1% y el 21,2%. En otro estudio similar, Sopp y Howard (2001) comprobaron que el porcentaje normal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es del 22,3% en sangre periférica de bovinos frisonos adultos. De la misma forma Wijngaard y col. (1992) consideran normal porcentajes de éstos linfocitos T en sangre periférica entre el 9% y 26%.

#### **2.3.2.1.- DETERMINACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN GANADO VACUNO**

La aplicación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales en la citometría de flujo ha permitido un rápido progreso en la definición y diferenciación de los antígenos leucocitarios en diversas especies animales.

En los últimos años se han obtenido un gran número de anticuerpos monoclonales específicos para la diferenciación de antígenos leucocitarios bovinos. Asimismo, la caracterización bioquímica de los antígenos leucocitarios de diversas especies ha permitido determinar que los antígenos leucocitarios de mamíferos se han conservado a lo largo de la evolución (Ledbetter y col., 1981).

Navarro y col. (1996) investigaron sobre la identificación de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica y su distribución en los órganos linfoides secundarios de ganado caprino, mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales de bovino. Estos autores comprobaron que estos anticuerpos monoclonales reconocían las subpoblaciones linfocitarias caprinas de una forma similar a lo que sucedía en el ganado bovino. Asimismo también determinaron que los porcentajes de linfocitos CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> predominaban en sangre periférica respecto de los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer).

Davis y col. (1987) emplearon anticuerpos monoclonales para el estudio de la relación filogenética y funcional de los antígenos de clase I y II del complejo mayor de

histocompatibilidad y de los antígenos leucocitarios en ganado vacuno y en otras especies. Asimismo, comprobaron que la citometría de flujo es la técnica más útil para el análisis primario de hibridomas productores de AcMo. Mediante el análisis con fluorescencia doble determinaron si un anticuerpo monoclonal reaccionaba con células mononucleares (linfocitos y monocitos) y/o con granulocitos. De la misma forma, comprobaron si los anticuerpos monoclonales eran específicos para reconocer antígenos presentes en poblaciones no idénticas de leucocitos.

Baldwin y col. (1988) realizaron un estudio mediante citometría de flujo sobre la distribución de células T bovinas en los tejidos y sus características funcionales, empleando para ello antígenos de diferenciación reconocidos por los anticuerpos monoclonales IL-A26, IL-A27 e IL-A28. El anticuerpo IL-A26 reconocía el homólogo bovino del CD2, designado BoT2, mientras que IL-A27/28 reaccionaban con un antígeno de células T maduras. Al emplear estos anticuerpos en los análisis de inmunofluorescencia doble fueron capaces de determinar tres poblaciones diferentes de células T de la especie bovina. La mayoría de las células T BoT4<sup>+</sup> o BoT8<sup>+</sup> también reaccionaban con IL-A26/27/28. Una segunda población estaría formada por una pequeña proporción de células que reaccionaban con IL-A26/27/28 y que eran BoT4<sup>-</sup> y BoT8<sup>-</sup>. La tercera población (menos del 5%) estaría compuesta por las células T BoT4<sup>-</sup> y BoT8<sup>-</sup> y que solo reaccionaban con la IL-A26. Las células T que reaccionan con los anticuerpos monoclonales constituyen, aproximadamente, el 60% de las células mononucleares de sangre periférica de ganado bovino.

Estos mismos autores en un estudio previo (Baldwin y col., 1986) habían comprobado que el antígeno BoT4, análogo al CD4, se encuentra en aproximadamente el 30% de las células mononucleares de sangre periférica, no expresándose en los monocitos y las células B. Asimismo esta proteína se encuentra en células de las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos.

Ellis y col. (1986) caracterizaron, mediante citometría de flujo, un subgrupo de linfocitos T de la especie bovina empleando un anticuerpo monoclonal (IL-A17) que reconocía una proteína designada BoT8, homóloga de la CD8 humana, y que se expresaba en la superficie de aproximadamente el 20% de los CMSP, una subpoblación de linfocitos localizada en las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos y el bazo. Estos autores también comprobaron que la doble expresión de las moléculas análogas a CD4 y CD8 se

producía en hasta un 2% de los linfocitos periféricos de los individuos normales, tal como habían comprobado anteriormente Ledbetter y col. (1981) en el hombre.

En veterinaria, y en concreto en el ámbito del estudio de las **enfermedades parasitarias**, la citometría de flujo se está utilizando desde hace años, principalmente en el estudio de la inmunidad celular y de los mecanismos efectores del sistema inmune relacionados con la sensibilidad o resistencia frente a diversas parasitosis.

Menten-Dedoyart y col. (2008) determinaron mediante citometría de flujo el efecto de la saliva de la garrapata sobre las poblaciones de células T examinando los ganglios linfáticos próximos a la zona de la picadura de garrapata. Estos autores comprobaron que los porcentajes de células CD3<sup>+</sup> (linfocitos T) y CD4<sup>+</sup> (linfocitos T colaboradores) en los ganglios linfáticos de los ratones infectados eran equivalentes a los de los ganglios linfáticos de los grupos testigo.

En un estudio en el que se valoraban distintas técnicas de diagnóstico para la theileriosis, Rocchi y col. (2006) describieron a la citometría como un método que permite la detección de esquizontes intracelulares de *Theileria parva* en las primeras etapas de la infección. La citometría de flujo les permitió la rápida identificación y cuantificación precisa de las células parasitadas con un alto grado de especificidad y sensibilidad.

De forma muy similar, Hein-Kristensen y col. (2009) comprobaron que la citometría de flujo es un método eficaz para el recuento de *Plasmodium* al emplear naranja de acridina como fluorocromo, ya que ofrece una clara discriminación entre los eritrocitos infectados y los no infectados. No obstante, detectaron ciertos inconvenientes cuando se trata de muestras de sangre de animales con infecciones crónicas o con parasitemias intensas debido al elevado número de reticulocitos que hacen difícil el diagnóstico en estos casos.

Fonseca y col. (2007), mediante citometría de flujo, observaron que las infecciones por *Plasmodium chabaudi chabaudi* transmitidas por la picadura del mosquito vector se caracterizaban por una parasitemia de menor duración a la observada después de la inyección directa de glóbulos rojos infectados por un clon de *P. chabaudi*. Asimismo, el número total de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-2 se redujo en el desafío con los glóbulos rojos infectados mientras que la reducción de las células productoras de IL-

4 fue menos significativa, sugiriendo una respuesta Th1 proporcionalmente más baja en los ratones infectados a través de mosquitos.

Severinová y col. (2005) estudiaron el efecto inmunomodulador de los extractos de las glándulas salivales de *Ixodes ricinus*, en los procesos inflamatorios en la piel y en los ganglios linfáticos regionales, durante la infección por el patógeno humano *Borrelia afzelii*. Estos autores comprobaron mediante citometría de flujo que los extractos inyectados junto con las espiroquetas reducían el número de leucocitos y linfocitos T gammadelta en la epidermis después de la infección. En los ganglios linfáticos, el efecto antiinflamatorio se manifestó mediante la disminución en el recuento celular total. Así demostraron la importancia de la saliva de la garrapata en la transmisión activa de *B. afzelii* gracias a sus efectos anti-inflamatorios.

La infestación por ácaros del género *Sarcoptes*, según diversos estudios depende del equilibrio entre la respuesta inmune Th1 y Th2. Lalli y col. (2004) evaluaron la expresión de las citoquinas mediante citometría de flujo y comprobaron que los extractos de dichos ácaro inhiben la producción de IFN- $\gamma$  en los ganglios linfáticos de ratones.

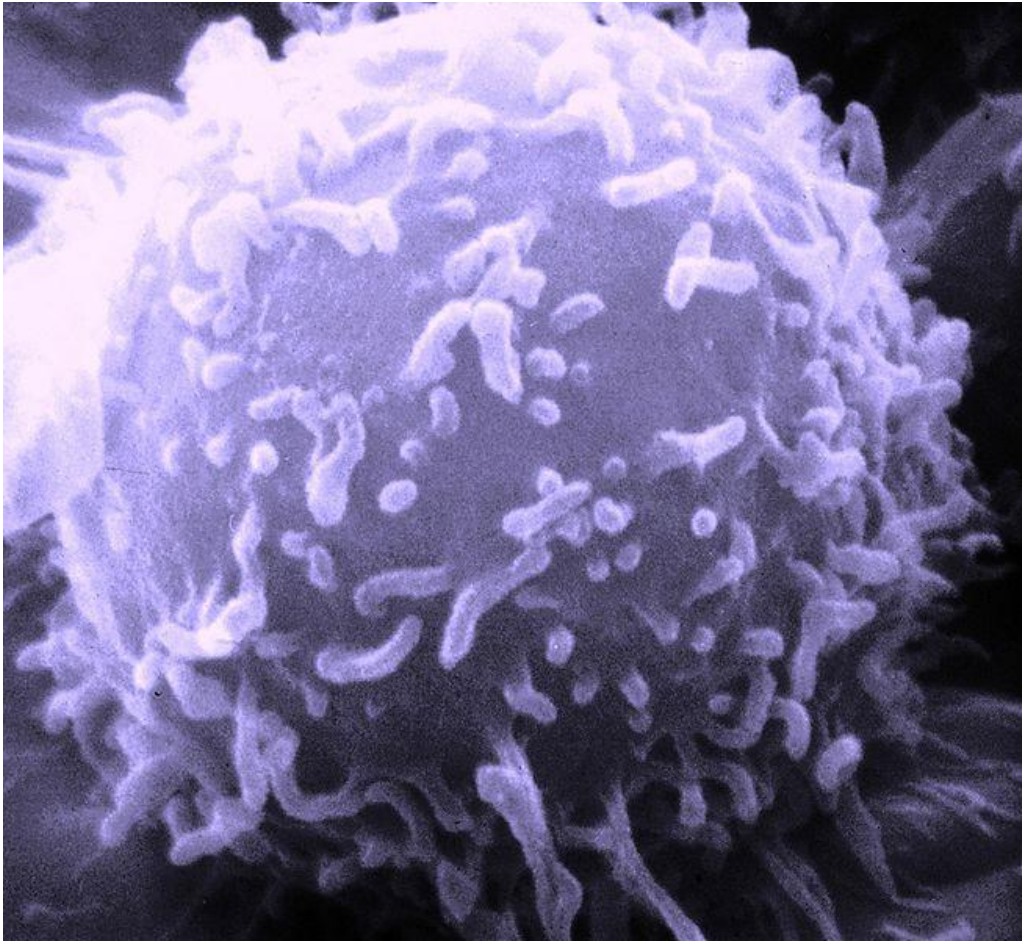
Swist y col. (2002) estudiaron el efecto de un extracto obtenido de las glándulas salivales de la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) sobre la proliferación linfocitaria en los bovinos. El extracto inhibió la proliferación de los linfocitos bovinos inducida por diferentes mitógenos.

La citometría de flujo también se aplicó al estudio de la respuesta inmune del ganado porcino. Así Alcaide (2005) estudió los mecanismos inmunes celulares más importantes que se desarrollan en el cerdo durante la infección experimental con *Metastrongylus apri*; comprobando que el perfil de la respuesta inmune celular desencadenada en cerdos infectados con una única dosis fue casi nula a nivel periférico, detectándose un ligero incremento en la población circulante de monocitos y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por su parte, los ganglios linfáticos torácico-pulmonares reaccionaron más activamente, incrementándose la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En los fluidos bronco alveolares se produjo un descenso significativo de la población de los macrófagos alveolares. En este mismo estudio, en animales reinfectados, a nivel sistémico se detectaron niveles significativamente elevados de monocitos. La reacción celular en los ganglios torácico pulmonares frente a la llegada de los estadios larvarios de *M. apri* al pulmón, se caracterizó por la correlación positiva entre el

número de larvas totales recuperadas en los pulmones y los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B y macrófagos. Por otra parte, comprobó que los animales pre-estimulados con antígenos del parásito mostraron niveles elevados de monocitos circulantes, registrándose una importante reacción de los linfocitos B y macrófagos, a nivel de los ganglios linfáticos torácicopulmonares.

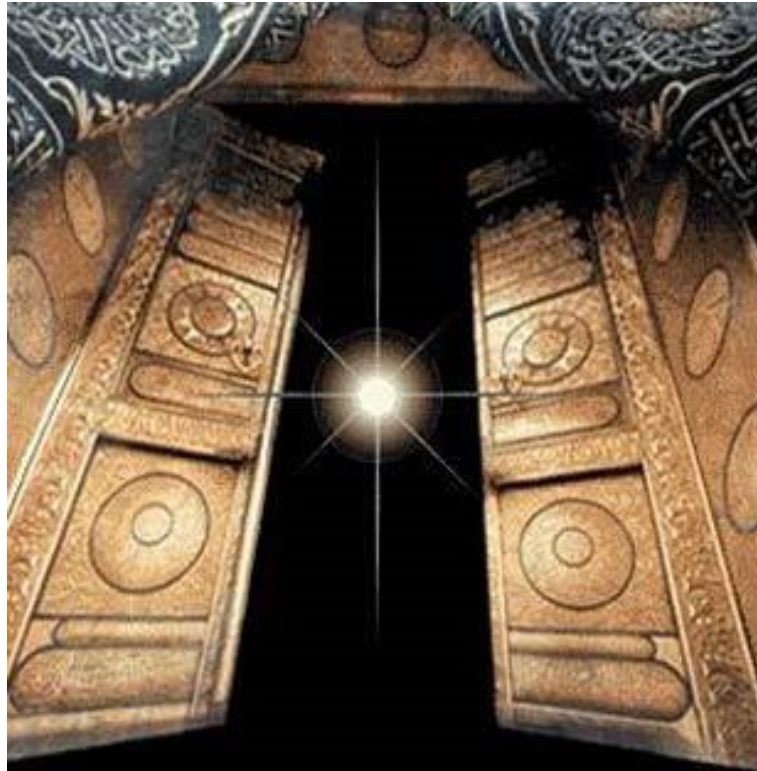
La citometría de flujo se muestra útil y se emplea con frecuencia en otros campos de la veterinaria, como el de las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, Olin y col. (2005) aplicaron la citometría de flujo para evaluar la actividad de los linfocitos tras la vacunación de los animales con *Mycobacterium bovis* y para detectar el antígeno específico de la actividad citolítica de estas micobacterias. Asimismo compararon la actividad citolítica de los linfocitos γδ con la de los linfocitos CD8<sup>+</sup>. En este estudio se concluyó que la citometría de flujo es una herramienta sensible y fiable para determinar, por ejemplo, la actividad citolítica de los linfocitos T γδ contra la micobacteria.





**CAPÍTULO 1:**

**RESPUESTAS CELULAR Y  
HUMORAL DURANTE LA FASE  
ESOFÁGICA DEL CICLO DE**  
***Hypoderma lineatum***



### **3.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**



De las seis especies descritas en el género *Hypoderma*, sólo dos parasitan de forma obligada al ganado vacuno: *Hypoderma bovis* e *Hypoderma lineatum*. En el Noroeste de España predomina *H. lineatum* frente a *H. bovis*, y además esta última plantea más dificultades para su detección en el matadero (Panadero y col., 2000a).

La migración intraorgánica de las larvas difiere con la especie de *Hypoderma*; en el caso de *H. lineatum*, se desplazan por el tejido conjuntivo laxo intermuscular de la parte anterior del pecho y del abdomen hasta la submucosa esofágica, donde permanecen temporalmente; además, se pueden hallar en otros lugares, como el tejido conjuntivo peritraqueal y periesofágico, la pleura, pericardio, diafragma, etc. (Khan, 1971; Panciera y col., 1993).

Durante su estancia en el esófago las L-1 pueden triplicar su tamaño, de modo que cuando llegan al esófago apenas sobrepasan los 4,6 mm de longitud, pero cuando lo abandonan para seguir su migración hacia el dorso, llegan a medir 14,6 mm (Panadero y col., 2007).

El diagnóstico parasitológico directo de la hipodermosis se basa en el conocimiento del ciclo interno del parásito y en la observación de los distintos estadios del ciclo de *Hypoderma* en el hospedador. Puede llevarse a cabo en el matadero, en cuyo caso se trata de un sencillo examen *post-mortem*, que pone en evidencia las larvas 1 de *H. lineatum* en la submucosa del esófago. En ocasiones, debido al tamaño reducido y aspecto transparente de las L-1 de *Hypoderma*, es más difícil su observación en el matadero; no obstante, la posibilidad de trasladar los esófagos al laboratorio para realizar su examen de forma meticulosa, facilita el hallazgo de *H. lineatum*, lo que permite obtener datos más precisos sobre la prevalencia y, en especial, sobre la cronobiología de esta especie.

Las larvas de *H. lineatum* originan en la submucosa esofágica una reacción claramente identificable que se caracteriza por la aparición de un edema gelatinoso con focos amarillentos acompañados con frecuencia de hemorragias petequiales alrededor de ellas. La intensidad de estas reacciones varía según se trate de primo o de reinfestaciones (Boulard, 1975; Arru y col., 1985).

En este primer capítulo estudiaremos, mediante citometría de flujo, hematología y ELISA, la respuesta celular y humoral que se produce durante la fase esofágica de *Hypoderma*

*lineatum*, empleando para ello animales infestados y no infestados sacrificados en un matadero, y planteándonos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Estudiar la respuesta de los linfocitos T ( $CD2^+$ ,  $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), en sangre y ganglios linfáticos mediastínicos en ganado vacuno infestado y no infestado por *H. lineatum*.
- 2.- Determinar asimismo, en animales infestados y no infestados por *H. lineatum*, los niveles de las diferentes poblaciones leucocitarias y eritrocitarias en sangre periférica.
- 3.- Realizar el seguimiento de los niveles de antígeno hipodermis C y de anticuerpos circulantes específicos (IgG, IgG1, IgG2 e IgM) durante la fase de permanencia de las L-1 en la submucosa esofágica.



## **3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.2.1.- ANIMALES EXAMINADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MUESTREOS

Para la realización de esta parte del estudio se tomaron muestras de un total de 629 bovinos de los cuales se seleccionaron 156 (Tabla 1). Estos animales fueron sacrificados en el matadero NOVAFRIGSA, situado a unos 10 Km. de la ciudad de Lugo, en el que se sacrifican habitualmente bovinos procedentes de diferentes zonas del noroeste de España.

Los muestreos se llevaron a cabo semanalmente desde octubre de 2006 a febrero de 2007, periodo en el cual, de acuerdo con Panadero y col. (1998; 2007), Fernández (2005) y Fernández y col. (2005) la mayor parte de las L-1 de *H. lineatum* se encuentran en el esófago y, al mismo tiempo, los niveles de antígenos y anticuerpos deberían ser elevados.

En cada visita al matadero se tomaron muestras de una media de 20 animales, incluyendo terneros (7-10 meses) que actuaron como testigos negativos y animales adultos (3-18 años). Los muestreos se dieron por concluidos cuando durante tres muestreos sucesivos no se detectaban animales parasitados.

Previamente al sacrificio, se seleccionaban unos 20 animales al azar, a los que se tomaron 3 muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea:

- Una muestra sanguínea en un tubo Vacutainer® de 10 ml estéril y cerrado al vacío con EDTA destinado a la realización del hemograma.
- Una muestra de sangre en un tubo Vacutainer® sin anticoagulante, para la obtención de suero con el que llevar a cabo los ELISAs para la detección de anticuerpos y antígeno circulantes.
- Una muestra de sangre en tubo Vacutainer® con ácido cítrico-dextrosa como anticoagulante, destinado a la citometría de flujo.

Además, de cada uno de esos animales se recogió, durante su faenado, el esófago, acompañado de al menos un ganglio linfático mediastínico (Imagen 12). Estas muestras se

introdujeron en una bolsa de plástico que se identificó individualmente y se trasladaron inmediatamente al laboratorio.



Imagen 12.- Recolección de esófagos en el matadero

### **3.2.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO**

#### **3.2.2.1.- Esófagos**

Una vez en el laboratorio se examinó detenidamente la superficie externa de los esófagos y posteriormente se abrió longitudinalmente la capa muscular observando la presencia de lesiones y larvas en la submucosa (Imagen 13). Las larvas se separaron cuidadosamente de sus adherencias, se midieron, se lavaron en PBS y para la posterior obtención del antígeno larvario se congelaron a -20°C.

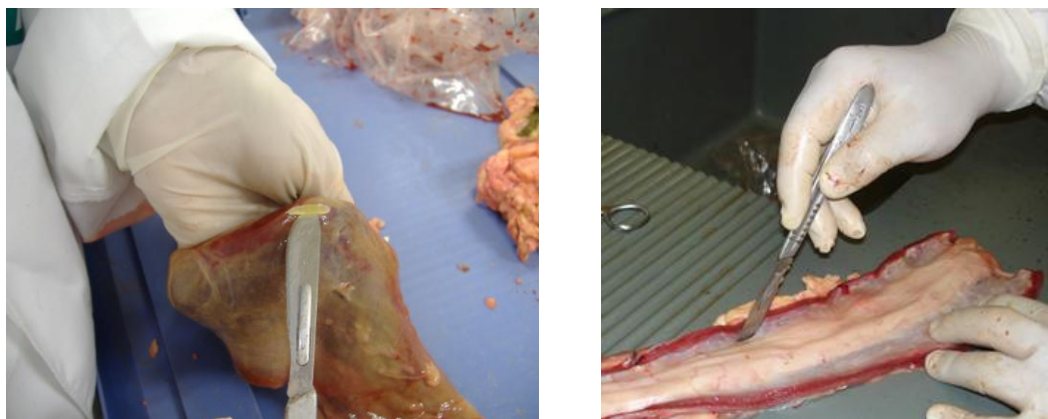


Imagen 13.- Detección y aislamiento de las larvas 1 de *H. lineatum* en la submucosa esofágica

Una vez confirmada o no la positividad de cada animal a larvas esofágicas, se seleccionaron los animales que formarían parte de este estudio (Tabla 1). Todos los bovinos que resultaron positivos se incluyeron en el estudio (54 animales), mientras que de los que resultaron negativos (548), solo se seleccionaron al azar 3 animales en cada muestreo.

| Animales muestreados          |                 | Total | Seleccionados |
|-------------------------------|-----------------|-------|---------------|
| Adultos                       | Positivos a L-1 | 54    | 54            |
|                               | Negativos a L-1 | 548   | 75            |
| Terberos (testigos negativos) |                 | 27    | 27            |
| TOTAL                         |                 | 629   | 156           |

Tabla 1.- Distribución de los animales empleados en este estudio

### **3.2.2.2.- Sangre**

Las muestras sin anticoagulante se dejaron reposar en el laboratorio a temperatura ambiente (18-20°C) durante varias horas, tras lo cual se introdujeron en frigorífico a 4°C para facilitar la retracción del coágulo. El suero se congeló a -20°C hasta su posterior empleo. Las muestras de suero se analizaron mediante ELISA sándwich para la detección de antígeno circulante y ELISA indirecto para la determinar la presencia de las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas.

Las muestras de sangre periférica recogidas con ACD se procesaron mediante citometría de flujo directa para la detección de los antígenos linfocitarios CD2, CD4 y CD8.

El hemograma se realizó en un coulter modelo Abacus Junior Vet (Diatron LaB, Austria). A partir de la sangre recogida con EDTA, se realizaron los recuentos de la serie blanca y roja.

Hay que señalar que las muestras de sangre de los animales que resultaron negativos a larvas esofágicas, y que no se incluyeron en el estudio, se desecharon antes del procesado.

### **3.2.2.3.- Ganglios linfáticos**

Los ganglios linfáticos de los animales seleccionados se cortaron con bisturí en pequeños fragmentos (2-3 mm de grosor) y se sumergieron en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4), permaneciendo en dicho medio 14 horas, para permitir la liberación de los linfocitos. Tras este periodo, se pasaron sucesivamente por agujas de diámetro decreciente (1,2, 0,8 y 0,6 mm) con el fin de disociar los agregados celulares e impedir su llegada al citómetro. Posteriormente se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se diluyó el sedimento en 1 ml de PBS.



La suspensión de células resultante se procesó por citometría de flujo directa para la detección de antígenos linfocitarios CD2, CD4 y CD8.

### 3.2.3.- PROTOCOLO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DIRECTA EN SANGRE PERIFÉRICA

Para la identificación de los antígenos linfocitarios CD2, CD4 y CD8 en sangre periférica, se siguió el siguiente protocolo:

- **Preparación de las muestras sanguíneas:** se empleó sangre entera con anticoagulante ACD. De cada uno de los animales se prepararon cuatro tubos con 200 µl de sangre entera.

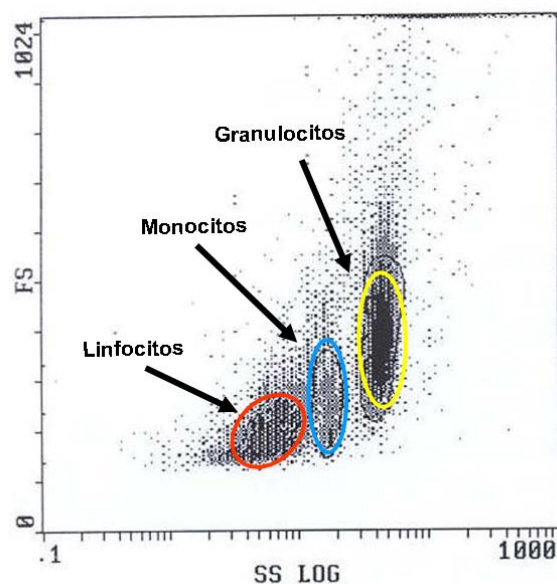
- **Adición del anticuerpo monoclonal:** a tres de los tubos se les añadió el correspondiente anticuerpo monoclonal (antiCD2, antiCD4 o antiCD8) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Serotec®, Reino Unido), a la dilución 1/20. Al cuarto tubo no se le añadió anticuerpo, actuando como testigo negativo. Las muestras se homogenizaron y se incubaron a 25°C en agitación durante 30 minutos.

Posteriormente, se añadieron 2 ml de tampón PBS/BSA 1% a cada tubo y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el anticuerpo no unido, eliminando el sobrenadante resultante.

- **Lisado de la serie roja:** para lisar los eritrocitos se añadió a cada tubo 2 ml del tampón de lisis BD FACS™ Lysing Solution (Beckton Dickinson). La mezcla se incubó a 25°C en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 400 µl de PBS/BSA al 1%.

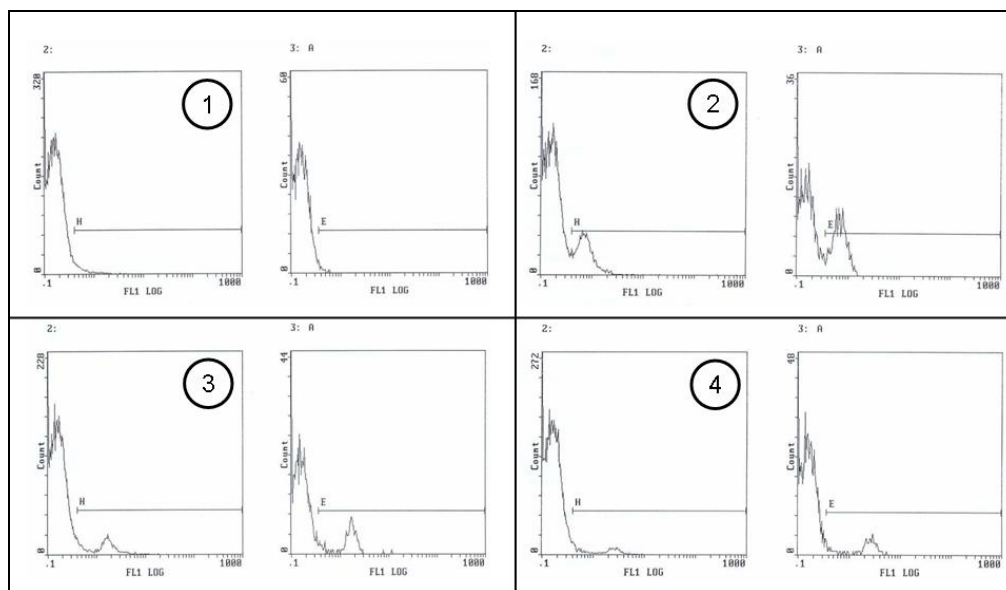
- **Obtención de los resultados en el citómetro de flujo:** las determinaciones se hicieron en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation, USA) que posee un láser de

Argón con una potencia de 15-mW y que trabaja a una longitud de onda de 488 nm. En cada análisis se cuantificó la fluorescencia verde emitida durante el paso de partículas en 100 segundos. Se seleccionaron los parámetros de dispersión lateral (SS) y frontal (FS) de la luz de modo que únicamente se analizaron los linfocitos en función de su fluorescencia (Imagen 14). La fluorescencia verde, emitida por el isotiocianato de fluoresceína, se detectó mediante el sensor FL1 a través de dos filtros que seleccionaban longitudes de onda comprendidas entre 525 nm y 550 nm. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa System II (Coulter Corporation, USA).



**Imagen 14.- Distribución de las distintas poblaciones celulares detectadas mediante citometría de flujo en las muestras de sangre periférica**

La fluorescencia emitida por la muestra a la que no se le añadió el anticuerpo se empleó para determinar la dispersión basal del haz de luz por parte de los linfocitos (Imagen 15). A la fluorescencia obtenida en las muestras a las que se les añadió el correspondiente anticuerpo, antiCD2, antiCD4 y antiCD8, se les restó la fluorescencia de la muestra testigo. Los resultados se muestran como el porcentaje de linfocitos que aparecen marcados con el correspondiente anticuerpo sobre el total de linfocitos.



**Imagen 15.-** Histogramas en los que aparecen representados los picos de fluorescencia emitida por la totalidad de las células (izda) y por la población de linfocitos (dcha) en cada una de las alícuotas: testigo (1), antiCD2 (2), antiCD4 (3) y antiCD8 (4).

### 3.2.4.- PROTOCOLO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DIRECTA EN LINFOCITOS AISLADOS DE GANGLIOS LINFÁTICOS

Los linfocitos aislados de los ganglios linfáticos se procesaron mediante citometría de flujo directa con objeto de identificar los antígenos linfocitarios CD2, CD4 y CD8, mediante el siguiente protocolo:

- **Preparación de las muestras linfocitarias:** para cada animal se prepararon 4 tubos con 200  $\mu$ l de PBS en el que se habían resuspendido los linfocitos.
- **Adición del anticuerpo monoclonal:** a tres de las alícuotas se les añadió el correspondiente anticuerpo, antiCD2, antiCD4 y antiCD8, conjugado con FITC (Serotec, Reino Unido), a la dilución 1/20. A la cuarta no se le añadió anticuerpo, actuando como testigo negativo. Las muestras se mezclaron bien y se incubaron a 25°C en agitación durante 30 minutos.

Posteriormente se añadieron 2 ml de tampón PBS/BSA al 1% y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar el anticuerpo no unido, en el sobrenadante resultante. Finalmente, se resuspendieron los linfocitos con 400 µl de PBS/BSA al 1%.

- **Lectura de los resultados en el citómetro de flujo.** Al igual que en el caso de la sangre periférica, el análisis se realizó en el citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation, USA). En cada análisis se cuantificó la fluorescencia verde emitida durante el paso de partículas en 100 segundos. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa System II (Coulter Corporation, USA).

### 3.2.5.- PROTOCOLO DEL ELISA SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN DE HIPODERMINA C CIRCULANTE

Para detectar hipodermina C circulante se empleó el ELISA sándwich descrito por Panadero y col. (2002) y que se detalla a continuación (Imagen 16).

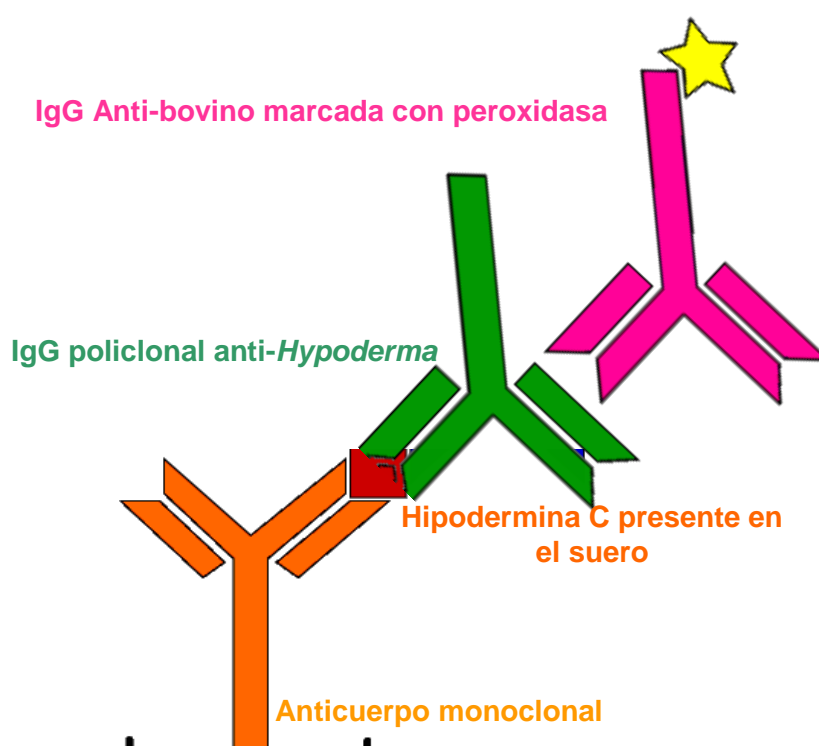


Imagen 16.- Diseño del ELISA sándwich o de captura

- **Sensibilización de las placas de microtitulación con el primer anticuerpo monoclonal:** los anticuerpos monoclonales fueron obtenidos por el Dr. Pearson (Universidad de Victoria, Canadá), siguiendo el protocolo de Tolson y col. (1989). Una vez elegido el anticuerpo monoclonal que ofrecía los mejores resultados, se procedió a sensibilizar placas de fondo plano (Nunc Maxisorb, Nunc International®) con el anticuerpo monoclonal, a una concentración de  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$  en tampón fosfato (PBS, pH 7,2) al que se le había añadido Tween 20 al 0,3% y seroalbúmina bovina al 3% (tampón de dilución) el

anticuerpo se añadió en todos los pocillos, con excepción de la columna 12 que actuó como blanco. A continuación se bloquearon los pocillos durante 30 minutos a 37°C con 200 µl de tampón de dilución (Imagen 16).

- **Adición de los sueros problema:** las muestras de suero problema, así como los sueros testigo positivo y negativo se diluyeron 10 veces en tampón de dilución y se depositaron 100 µl/pocillo. Cada suero se ensayó por duplicado y se consideró la media de ambos valores. Para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo específicos, la placa se incubó de nuevo, durante 1 hora a 37°C; transcurrido este tiempo se lavaron 4 veces con 100 µl de PT.

- **Segundo anticuerpo policlonal:** el anticuerpo policlonal de bovino antihipodermina C se obtuvo de vacas infestadas por *Hypoderma* spp. Las IgG específicas se purificaron mediante cromatografía de afinidad mediante el kit MAbTrap G II (Pharmacia Biotech, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este anticuerpo se empleó a la dilución 1/1000. Tras incubar las placas durante 30 minutos a 37°C, se lavó 3 veces con PT y finalmente 2 veces más con PBS.

- **Inmunoconjugado:** como tercer anticuerpo se emplearon anticuerpos de conejo anti-IgG de vaca marcados con peroxidasa (RaB/IgG (H+L)/PO, Nordic Immunology). El inmunoconjugado se diluyó 1/1000 en tampón de dilución y después de depositar 50 µl en cada pocillo, se incubaron las placas durante 30 minutos a 37°C. A continuación se lavaron 3 veces con PT y finalmente 2 veces más con 100 µl de PBS.

- **Revelado de la reacción:** para valorar la actividad de la enzima peroxidasa empleamos OPD (ortofenilendiamina, Sigma). La dilución del sustrato se realizó en tampón citrato (pH 5) y agua oxigenada al 30%. Se depositaron 100 µl de esta dilución en cada pocillo y las placas se colocaron en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 3N a cada pocillo. Posteriormente, las placas se dejaron en reposo, durante 5-10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La lectura de las densidades ópticas se realizó en un espectrofotómetro modelo 680-XR<sup>®</sup> de la firma Bio-Rad con un filtro de 490 nanómetros.

Los sueros de referencia empleados para la puesta a punto de los test ELISAs procedían de una población de sueros positivos obtenidos de vacas en las que con anterioridad se habían observado nódulos larvarios en el dorso, y de una población de sueros negativos, procedentes de animales que nunca habían salido al pasto.

### 3.2.6.- PROTOCOLO DEL ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS G

La detección de anticuerpos se realizó siguiendo el protocolo de Panadero (1996) con algunas modificaciones (Imagen 17).

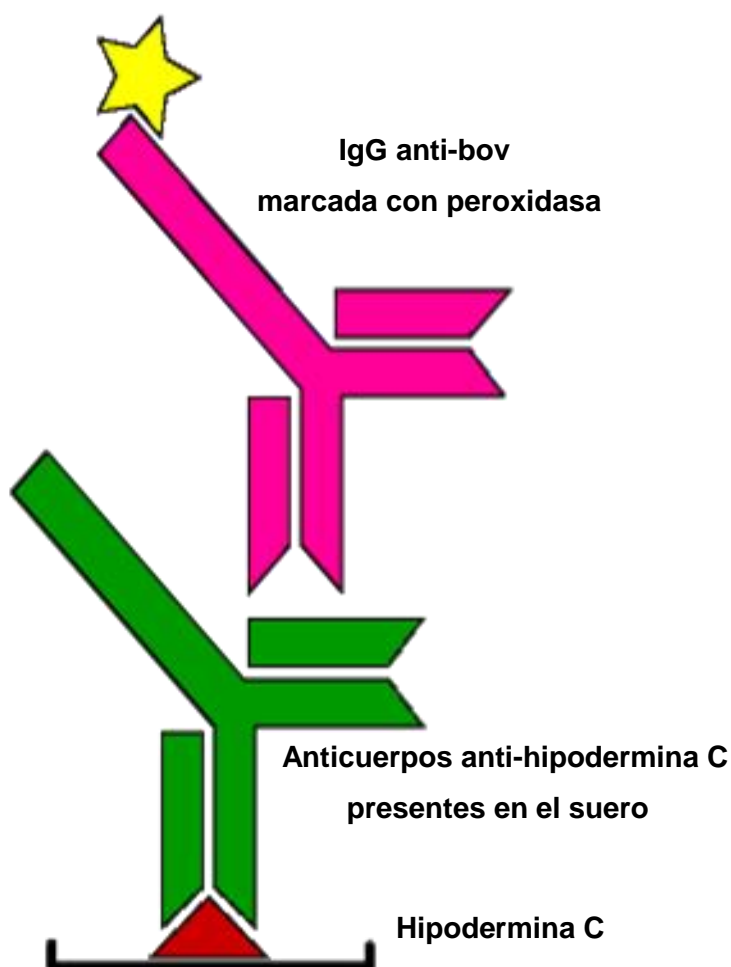


Imagen 17.- Diseño del ELISA indirecto

- **Sensibilización de las placas:** la inmunoadsorción del antígeno se llevó a cabo en placas blandas de microtitulación de Polyethylene Terephthalate Glycol (P.E.T.G.), de 96 pocillos de 300 µl de fondo plano (Costar®), depositando 100 µl de hipodermina C (4 mg ml<sup>-1</sup>) en tampón PBS (pH 7,5). El antígeno se dispuso en todos los pocillos, excepto en la columna 12 que actuó como blanco. Las placas se incubaron a 37°C, durante 1 hora y transcurrido este tiempo se eliminó la solución sensibilizante sin lavar. Con objeto de minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la placa, se usó como agente bloqueante leche descremada en polvo disuelta al 2% en PT (PTL). En todos los pocillos se dispusieron 200 µl de esta solución y se incubaron las placas a 37°C, durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se retiró la solución bloqueante sin lavar.

- **Adición de los sueros problema:** las muestras de sueros problema, así como los sueros control positivo y negativo se diluyeron 10 veces en PTL y se depositaron 100 µl en cada pocillo. Cada suero se ensayó por duplicado y se consideró la media de ambos valores. Para permitir la formación de complejos antígeno-anticuerpo específicos, las placas se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37° C; posteriormente se lavaron 4 veces con 100 µl de PT. De este modo se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido al antígeno.

- **Inmunoconjugado:** a continuación se procedió a la adición del inmunoconjugado constituido por anticuerpos de conejo anti-IgG marcados con peroxidasa (RAB/IgG (H+L)/PO, Nordic Immunology) a una dilución 1/1000 en PTL.

- **Revelado de la reacción:** finalmente, para valorar la actividad de la enzima peroxidasa empleamos OPD (Sigma). La dilución del sustrato se realizó en tampón citrato (pH 5) y agua oxigenada al 30%. Se depositaron 100 µl en cada pocillo y las placas se colocaron en oscuridad durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción enzimática se detuvo añadiendo, a cada pocillo, 100 µl de ácido sulfúrico 3N. Finalmente, las placas se dejaron en reposo durante 5-10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La lectura de las densidades ópticas se realizó en un espectrofotómetro modelo 680-XR® (Bio-Rad) y con un filtro de 490 nanómetros.



### 3.2.7.- PROTOCOLO DEL ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN LAS IgG1, IgG2 E IgM

La detección de estas inmunoglobulinas se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- **Sensibilización de las placas:** la inmuoadsorción del antígeno se llevó a cabo en placas blandas de microtitulación de P.E.T.G., de 96 pocillos de fondo plano (Nunc International), depositando 100  $\mu$ l de hipodermina C (4 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) en tampón PBS (pH 7,5). El antígeno se dispuso en todos los pocillos, excepto en la columna 12 que actuó como blanco. Las placas se incubaron a 37°C, durante 30 minutos en agitación y después se eliminó la solución sensibilizante lavando 3 veces con tampón fosfato (PBS, pH 7,2) al que se le había añadido Tween 20 al 0,3%.

Con objeto de minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la placa, se usó como agente bloqueante leche descremada en polvo disuelta al 2% en PT. En todos los pocillos se dispusieron 200  $\mu$ l de esta solución y se incubaron las placas a 37°C, durante 30 minutos; transcurrido este tiempo se retiró la solución bloqueante, lavando 3 veces con PT.

- **Adición de los sueros problema:** las muestras de sueros problema, así como los sueros control positivo y negativo se diluyeron 10 veces en PTL y se depositaron 100  $\mu$ l en cada pocillo. Cada suero se ensayó por duplicado y se consideró la media de ambos valores. Para permitir la formación de complejos antígeno-anticuerpo específicos, las placas se incubaron de nuevo durante 1 hora a 37° C en agitación; posteriormente se lavaron 4 veces con 100  $\mu$ l de PT. De este modo se eliminaron los anticuerpos que no se habían unido a los antígenos.

- **Inmunoconjugado:** a continuación se procedió a la adición del inmunoconjugado constituido por anticuerpos policlonales de oveja anti-IgG1, anti-IgG2 y anti-IgM de bovino (Serotec®, Reino Unido) marcados con peroxidasa diluidos en PTL. Las diluciones empleadas variaron en función del anticuerpo: ShAB IgG1 a un factor de dilución 1/5.000, ShAB IgG2 a 1/500 y ShAB IgM a 1/20.000. Estos anticuerpos se incubaron a 37°C durante

30 minutos en agitación. Previamente al paso siguiente, se lavaron las placas 3 veces con PT y 2 veces con PBS.

- **Revelado de la reacción:** se realizó siguiendo el mismo protocolo que para la detección de las IgG totales.

### 3.2.8.- NORMALIZACIÓN DE LAS ABSORBANCIAS

Para estandarizar las absorbancias obtenidas en las diferentes placas utilizadas en el estudio, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- ❶ Para la normalización de cada placa se restó la media de los valores de la densidad óptica de los pocillos que se utilizaron como blanco (columna 12) al resto de los pocillos de dicha placa.

- ❷ La normalización de todas las placas se llevó a cabo calculando el valor medio de las absorbancias de los testigos positivos de todas las placas en conjunto.

- ❸ El factor de normalización de cada placa se obtuvo dividiendo el valor medio de cada una entre el valor medio total. Para poder normalizar las absorbancias de cada pocillo se dividió el valor de su densidad óptica por su correspondiente factor de normalización de placa.

### 3.2.9.- DETERMINACIÓN DE LOS VALORES HEMATOLÓGICOS

Las muestras de sangre con EDTA se procesaron para determinar las diferentes poblaciones celulares mediante un contador hematológico semiautomático Abacus Junior Vet (Diatron LaB, Austria) que analiza hasta 18 parámetros hematológicos. Los parámetros considerados en este estudio fueron los siguientes:

- WBC (glóbulos blancos totales)
- LYM (linfocitos)
- MID (monocitos y parte de eosinófilos)
- GRA (granulocitos)
- LY% (porcentaje de linfocitos)
- MI% (porcentaje de monocitos)
- GR% (porcentaje de granulocitos)
- RBC (glóbulos rojos)

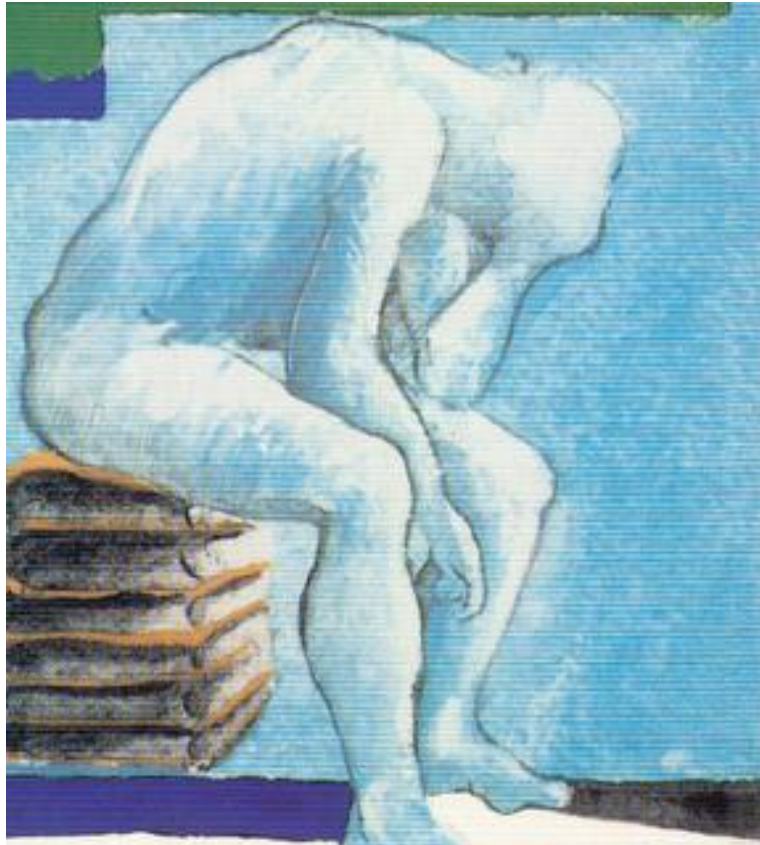
### 3.2.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 18.0.1. SPSS Inc, Chicago (2009).

Los análisis estadísticos comprendieron la determinación de los parámetros descriptivos, media y desviación estándar, de las variables valoradas tanto en el estudio citométrico (marcadores CD2, CD4 y CD8), hematológico (eritrocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos) y los del enzimoimmunoensayo (HyC, IgG totales, IgG1, IgG2 e IgM).

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios de las distintas poblaciones celulares y las densidades ópticas para los distintos grupos de animales (infestados, no infestados y terneros). Una vez demostradas las diferencias, con objeto de determinar entre

qué grupos se producían dichas diferencias, se aplicó la prueba de comparación múltiple post-hoc de Bonferroni.



### **3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 3.3.1.- DETECCIÓN DEL ANTÍGENO HIPODERMINA C Y DE LOS ANTICUERPOS CIRCULANTES DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE *H. lineatum*

#### 3.3.1.1.- Hipodermina C

La detección de antígenos liberados por las larvas de *Hypoderma* durante su migración nos permite diferenciar entre animales con infestaciones activas o muy recientes de aquellos que han estado en contacto con el parásito en temporadas previas y en los que todavía se mantienen niveles detectables de anticuerpos.

En la figura 3.1 se muestran los niveles de hipodermina C de todos los animales incluidos en este estudio. Los animales adultos tanto infestados como no infestados presentaron valores de DO muy similares ( $0,128 \pm 0,275$  en los no infestados y  $0,129 \pm 0,239$  en los infestados). La DO en los terneros se mantuvo, como era de esperar, en niveles muy bajos.

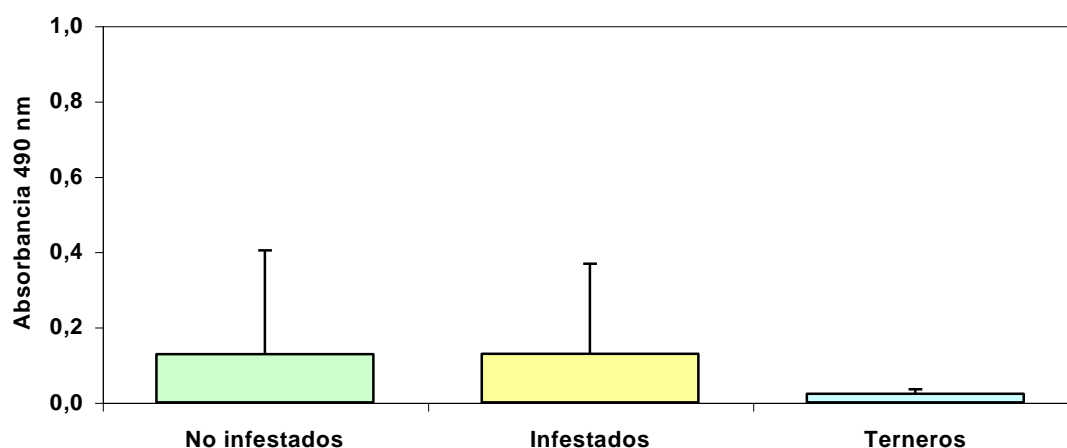


Figura 3.1.- Niveles séricos de hipodermina C en los tres grupos de animales

Mediante análisis de varianza no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de hipodermina C de los tres grupos de animales.

Es reseñable el hecho de que, en las vacas no infestadas, los niveles de antígeno fueron similares a los de las infestadas, hasta el punto de que en algunas vacas negativas se detectaron incluso niveles bastante elevados de hipodermina C circulante. No obstante, este hecho puede tener varias explicaciones; en primer lugar, las L-1 pasan un tiempo en la submucosa esofágica tras lo cual reanudan su migración, de modo que podría tratarse de infestaciones en las que las larvas todavía no hubieran llegado al esófago o por el contrario, ya lo hubieran abandonado. Además debe tenerse en cuenta que, en condiciones naturales, como sucede en este estudio, en las que el número de larvas infestantes puede ser muy variable y el desarrollo larvario no es sincrónico, la interpretación de nuestros resultados es mucho más difícil y puede diferir considerablemente de la señalada bajo condiciones experimentales por otros autores. En segundo lugar, la presencia de larvas ectópicas, que completan su fase de reposo en otras localizaciones (tejido conjuntivo peritraqueal, pleura, pericardio, diafragma, etc.) no es un hecho excepcional (Khan, 1971; Panciera y col., 1993; Panadero y col., 2007) y podría explicar los niveles elevados de HyC en los animales que no presentaban larvas en el esófago. Por último, otra posibilidad sería la muerte reciente de las L-1 ante la respuesta del sistema inmune del hospedador o bien por efecto de un tratamiento temprano, que destruiría las larvas durante su estancia en el esófago, provocando la liberación de antígeno que posteriormente se detectaría.

El hecho de que durante esta fase no se hayan encontrado diferencias significativas entre los niveles de antígeno de los animales positivos y los negativos (tanto en vacas como en terneros) podría deberse a que, de acuerdo con Panadero y col. (2002, 2007), durante la fase esofágica, la cantidad de HyC que se libera a los tejidos es moderada, mientras que posteriormente, coincidiendo con la migración y llegada de las larvas al dorso, se libera mayor concentración de antígeno.

Además, la cifra media de L-1 de los animales positivos fue moderada (12 larvas), con un rango que osciló entre 1 y 49 larvas/esófago. Alguno de estos niveles de infestación, relativamente reducidos, podrían haber contribuido a la ausencia de diferencias entre animales infestados y no infestados.



### 3.3.1.2.- Detección de anticuerpos circulantes mediante ELISA indirecto

#### • Inmunoglobulinas G totales

En la figura 3.2 se observa que los niveles de anticuerpos fueron más elevados en los animales adultos que en los jóvenes, y entre los primeros, los más altos se encontraron en los animales infestados.

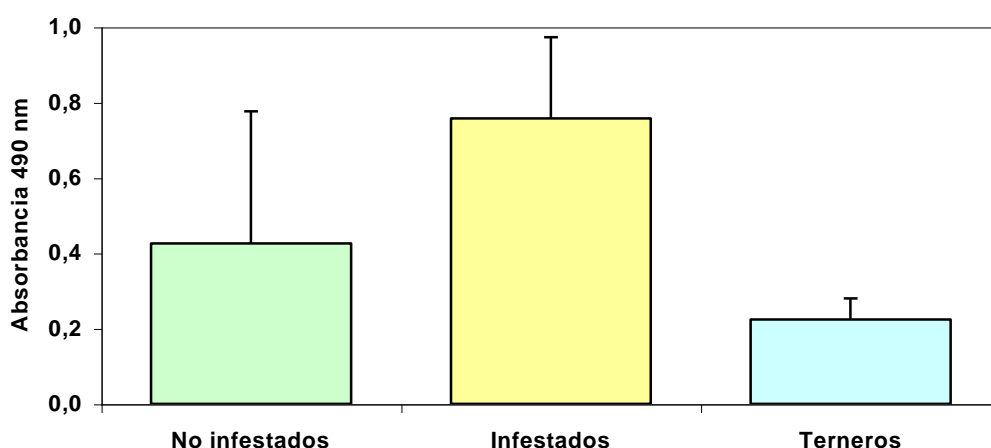


Figura 3.2.- Niveles medios de IgG totales en los tres grupos de animales

Mediante ANOVA observamos diferencias entre los niveles de IgG de los 3 grupos de animales ( $F= 13,459$ ;  $P< 0,001$ ); además la prueba post-hoc de Bonferroni evidenció que los niveles de IgG eran significativamente más altos en los animales adultos que presentaban L-1 de *Hypoderma lineatum* que en los del grupo no infestado ( $P= 0,001$ ) y en el de los terneros ( $P< 0,001$ ).

El ELISA indirecto ha sido la técnica más empleada para determinar la prevalencia por *Hypoderma* en distintos países (Boulard, 1985; Colwell y Baron, 1990; Martínez-Moreno y col., 1992; Morrondo, 1998; Panadero y col., 2000a; Otranto y col., 2001) y ha constituido un elemento primordial en los programas de erradicación de esta miasis (Boulard, 1985;

Tarry, 1987; Benakhla y col., 1993). No obstante, esta técnica posee el inconveniente de que los anticuerpos pueden estar presentes en ausencia de larvas activas, es decir, después de que todas las larvas maduras hayan abandonado al hospedador (Sinclair y col., 1984; Colwell y Baron, 1990) o después de haber sido destruidas por la aplicación de un tratamiento adecuado (Colwell y col., 1997; Panadero y col., 1997), por lo que estos hechos podrían explicar los niveles más elevados de anticuerpos que presentaron las vacas no infestadas con respecto a los terneros.

Conforme se va desarrollando el ciclo interno de *Hypoderma*, los anticuerpos experimentan un incremento constante que alcanza sus valores máximos con la aparición de los primeros nódulos larvarios en el dorso de los animales. Pruett y Barrett (1985) y Panadero y col. (2001) comprobaron que, durante la estancia de las L-1 en los lugares de reposo, los niveles de anticuerpos se mantenían constantes y relativamente elevados.

#### • *Inmunoglobulinas G, subclase 1*

Como se observa en la figura 3.3, los niveles de IgG1 en los animales infestados, fueron más elevados que en los bovinos no infestados (vacas y terneros). En este caso, la diferencia entre los dos grupos de animales no infestados fue mínima ( $0,055 \pm 0,056$  vs  $0,041 \pm 0,028$ ).

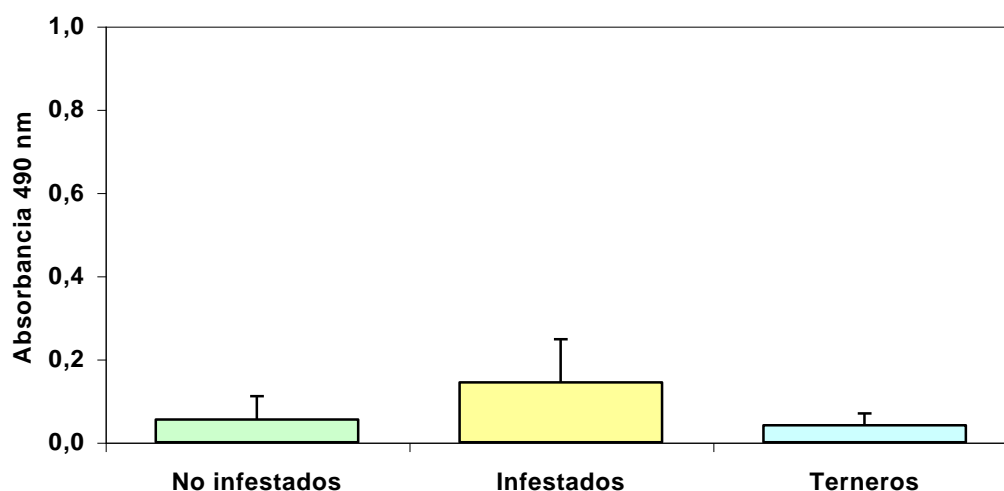
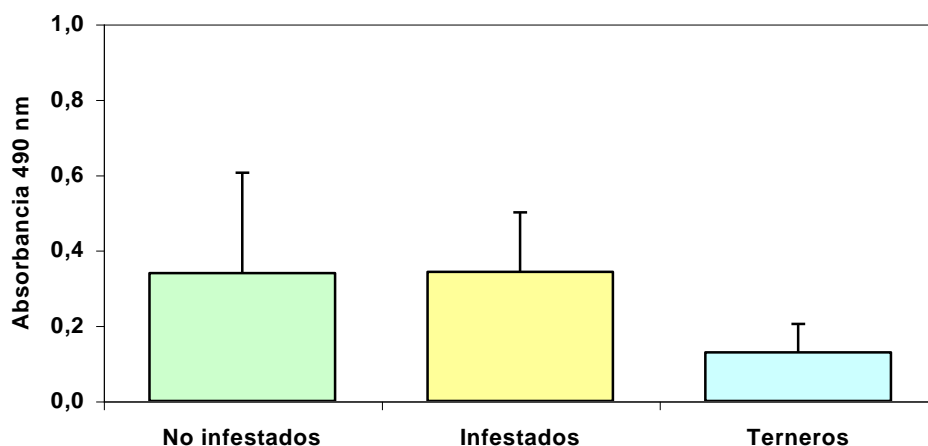


Figura 3.3.- Niveles medios de IgG1 en los tres grupos de animales

El análisis de varianza reveló la existencia de diferencias en los niveles de IgG1 entre los distintos grupos de animales ( $F= 16,632$ ;  $P< 0,001$ ). Mediante el test de Bonferroni se determinó que los valores de IgG1 eran significativamente mayores en los animales adultos que presentaban L-1 de *H. lineatum* respecto de lo observado en los animales adultos no infestados ( $P< 0,001$ ) y en los terneros ( $P< 0,001$ ).

#### • Inmunoglobulinas G, subclase 2

En el caso de las IgG2 (Figura 3.4), los dos grupos de animales adultos presentaron niveles muy similares ( $0,339\pm 0,267$  en los no infestados vs  $0,343\pm 0,158$  en los infestados).



**Figura 3.4.- Niveles medios de IgG2 en los tres grupos de animales**

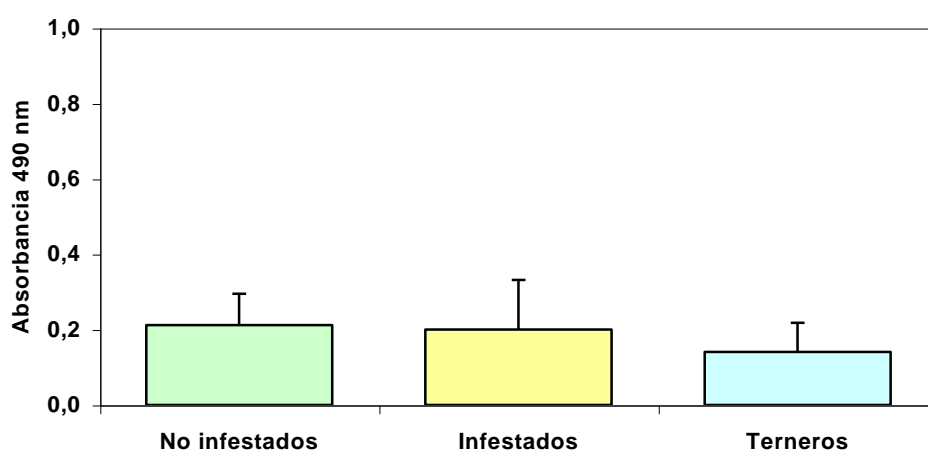
Mediante ANOVA comprobamos que existían diferencias en los niveles de IgG2 entre los tres grupos de animales del estudio ( $F= 4,212$ ;  $P= 0,018$ ); además la prueba post-hoc de Bonferroni demostró que las diferencias residían entre el grupo de los terneros y los otros dos grupos, siendo los niveles de IgG2 menores en los terneros respecto de los adultos que presentaban L-1 en la submucosa ( $P= 0,025$ ) y de los que no las tenían ( $P= 0,029$ ).

Hay que resaltar los niveles elevados de IgG2 que presentaron las vacas no intestadas, se mantuvieron en la misma proporción que las infestadas. Si tenemos en cuenta que los niveles elevados de IgG2 se asocian a una respuesta inmunitaria celular o de tipo Th1 (Tizard, 2009), cabe pensar que parte de las vacas que no presentaron L-1 hubieran desarrollado una respuesta celular intensa capaz de encapsular o destruir las larvas durante su migración.

Por el contrario, tal como vimos en el apartado anterior, las subclases IgG1 en este grupo de animales se mantuvieron al mismo nivel que el de los terneros.

- **Inmunoglobulinas M**

Al igual que en el caso anterior, la inmunoglobulina M presentó niveles de absorbancia muy similares en los dos grupos de animales adultos (Figura 3.5), mientras que en los terneros las cifras fueron más bajas ( $0,141 \pm 0,077$ ).



**Figura 3.5.- Niveles medios de IgM en los tres grupos de animales**

Mediante ANOVA no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las cifras de absorbancia de IgM de los tres grupos de animales del estudio.

Esta ausencia de diferencias coincide con estudios previos (Barral, 2000; Panadero y col., 2001) en los que se vio que los niveles de este anticuerpo apenas variaban a lo largo del ciclo del parásito y que ni siquiera se veían modificados tras la aplicación de un tratamiento temprano.

### **3.3.2.- ANALISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE *H. lineatum***

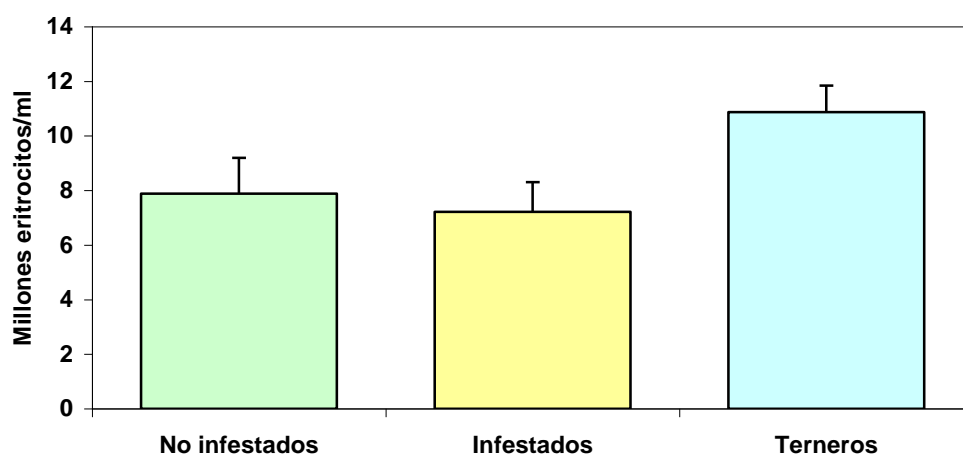
En este apartado nos propusimos establecer la posible relación entre la presencia de L-1 de *Hypoderma lineatum* en la submucosa esofágica y las principales poblaciones sanguíneas.

Debemos tener en cuenta que los diferentes estados fisiológicos (gestación, parto, lactación, etc.) en los que se podían encontrar los animales que formaron parte de este estudio, conjuntamente con la falta de especificidad de la respuesta celular, nos aconseja interpretar con cautela los resultados obtenidos.

#### **3.3.2.1.- Recuento de eritrocitos**

Aunque las variaciones más importantes causadas por los parásitos se observan en las distintas poblaciones de la serie blanca, también hemos incluido el estudio de las posibles alteraciones en los recuentos de la serie roja.

En la figura 3.6 se observa que en los terneros las cifras de eritrocitos era mayor que en los bovinos de mayor edad.



**Figura 3.6.- Recuento de eritrocitos en los tres grupos de animales**

El análisis de varianza reveló que existían diferencias estadísticamente significativas en las cifras de eritrocitos entre los tres grupos de animales ( $F= 45,919$ ;  $P< 0,001$ ). Mediante la prueba post-hoc de Bonferroni se comprobó que el número de eritrocitos era significativamente mayor en los terneros que en el grupo de los adultos no infestados ( $P< 0,001$ ) y en el de los adultos infestados ( $P< 0,001$ ).

Los recuentos eritrocitarios de los animales empleados en este estudio, variaron entre los  $7,9 \times 10^6$  eritrocitos  $\text{ml}^{-1}$  en los no infestados y los  $7,2 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$  en los infestados, manteniéndose dentro de los límites fisiológicos ( $5-8 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$ ) para la especie bovina, según Rosenberg (1990). En el caso de los terneros, normalmente estos valores son superiores a los de los animales adultos, de modo que las diferencias encontradas en este estudio no podrían atribuirse a la infestación por *H. lineatum*.

Apenas existen referencias relativas al efecto de la infestación por *Hypoderma* sobre la serie roja. Panadero (1996) comprobó que, en vacas frisonas infestadas naturalmente por *Hypoderma* spp., el número de eritrocitos se mantenía dentro de los límites normales para la especie bovina.

### 3.3.2.2.- Recuento de leucocitos

Los leucocitos representan las poblaciones celulares que más varían durante las infestaciones parasitarias, incluida la hipodermosis (Panadero, 1996).

En la figura 3.7 se muestran los recuentos totales de glóbulos blancos obtenidos en los tres grupos de animales, que de acuerdo con Rosenberger (1990) se encontraban dentro de los valores fisiológicos para las vacas adultas ( $5-10 \times 10^3$  leucocitos  $\text{ml}^{-1}$ ). Es de destacar que las cifras fueron mayores en terneros que en los adultos, como ocurre fisiológicamente (Rosenberger, 1990). En el caso de los adultos, el número de leucocitos detectado en los animales positivos fue ligeramente inferior ( $6,8 \pm 2,5 \times 10^3$   $\text{ml}^{-1}$ ) que el observado en los no infestados ( $6,9 \pm 2,0 \times 10^3$   $\text{ml}^{-1}$ ).

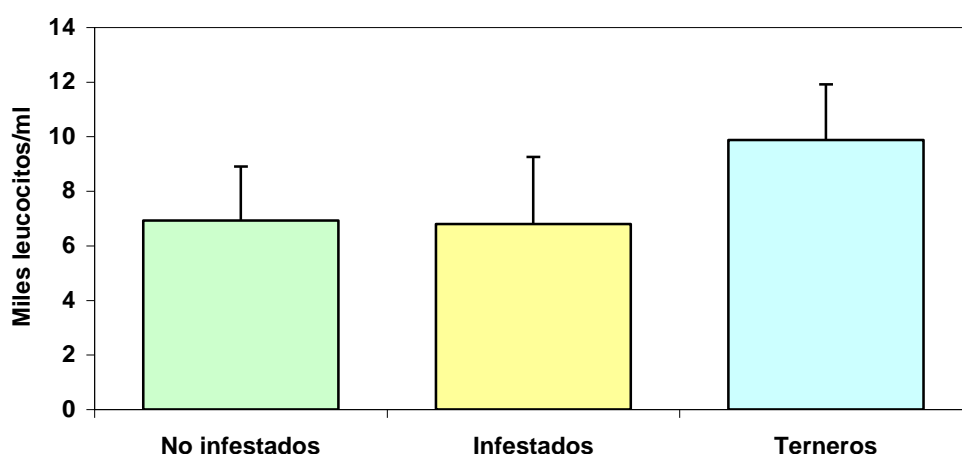


Figura 3.7.- Recuento de leucocitos en los tres grupos de animales

Mediante el test ANOVA se comprobó que existían diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de leucocitos obtenidos en los tres grupos de animales ( $F= 13,271$ ;  $P< 0,001$ ). Tras realizar la prueba post-hoc de Bonferroni se demostró que el recuento de leucocitos era significativamente mayor en los terneros respecto de los adultos no infestados ( $P< 0,001$ ) y de los adultos infestados ( $P< 0,001$ ).

Nuestros resultados coinciden con lo observado por Gingrich (1980) y Panadero (1996), quienes comprobaron que las cifras de leucocitos disminuían durante la



permanencia de las larvas en los lugares de reposo invernal. En nuestro estudio los valores de los dos grupos de animales adultos presentaron niveles de leucocitos similares.

En otras miasis cutáneas como la producida por *Dermatobia hominis*, Gonçalves y col. (2007) comprobaron que la infestación por L-1 y L-2 reducía el número de leucocitos, lo que se debería al efecto quimiotáctico de los productos larvarios que inducirían la migración de las células blancas hacia las áreas afectadas y la disminución de los niveles circulantes.

### 3.3.2.3.- Determinación de las distintas poblaciones leucocitarias

Los leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas cuyo objetivo es actuar como células efectoras de la respuesta inmune, y por tanto intervienen en la defensa del organismo frente a diferentes antígenos. Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático y se encuentran en la sangre de forma transitoria. Cada una de las poblaciones leucocitarias se caracteriza por desempeñar funciones específicas dentro de los mecanismos inmunitarios y dependiendo de la demanda en los tejidos se puede estimar su presencia en la circulación sanguínea.

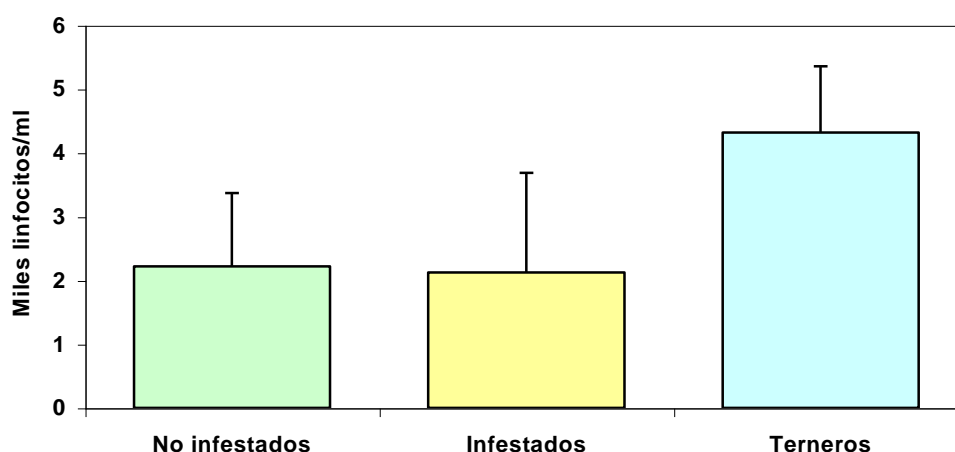
#### • *Linfocitos*

Los linfocitos son los leucocitos de menor tamaño (5-15  $\mu\text{m}$ ) y se localizan fundamentalmente en los órganos linfoides. Poseen receptores específicos de antígenos y, entre sus funciones se encuentra la producción de anticuerpos, además de ser los encargados de la inmunidad específica o adquirida.

En la figura 3.8 se observa que los recuentos de linfocitos resultaron inferiores en los animales adultos que en los terneros que formaron parte de este estudio, lo cual coincide con Rosenberger (1990) quien afirma que los terneros poseen valores normales de linfocitos

superiores ( $6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , 5 a  $12 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) que los animales adultos ( $4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , 2,5 a  $5,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ).

En el caso de los animales adultos, esta población linfocitaria resultó ligeramente superior en los bovinos que no presentaban L-1 en la submucosa ( $2,1 \pm 1,6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) respecto de los infestados ( $2,2 \pm 1,2 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ). En estos animales, los niveles de linfocitos se mantuvieron ligeramente por debajo del límite mínimo descrito por Rosenberger (1990) quien, para los bovinos adultos, consideró como normales valores de  $2,5\text{-}5,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ .



**Figura 3.8.- Recuento de linfocitos circulantes en los tres grupos de animales**

El análisis de varianza demostró que existían diferencias significativas en el recuento de linfocitos entre los tres grupos de animales ( $F = 13,139$ ;  $P < 0,001$ ) y mediante la prueba de Bonferroni se comprobó que las diferencias se producían entre el grupo de los terneros y el de los adultos no infestados ( $P < 0,001$ ) e infestados ( $P < 0,001$ ).

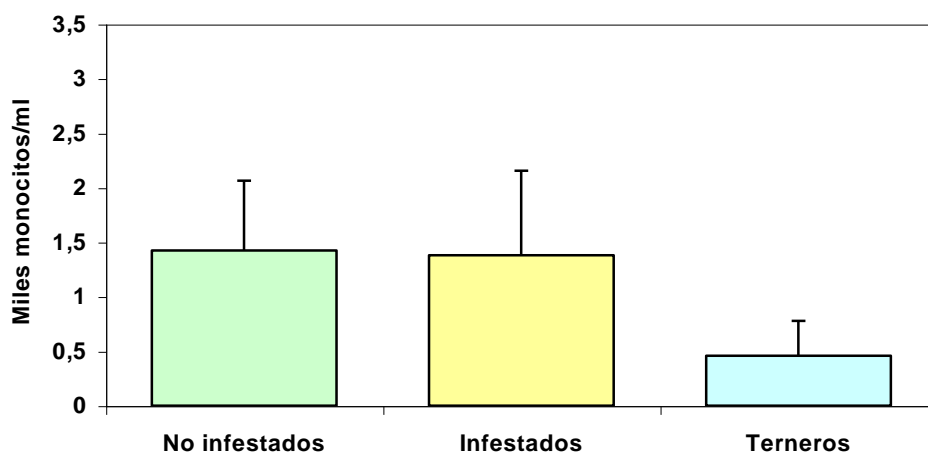
El hecho de que las cifras de linfocitos en los animales infestados fueran iguales e incluso inferiores a las de los no infestados, corrobora lo descrito por Panadero (1996) en ganado vacuno infestado naturalmente por *Hypoderma* respecto de que las cifras de linfocitos se mantenían en niveles reducidos durante el periodo de reposo larvario. Del mismo modo, Chabaudie y Boulard (1992) y Moiré y col. (1997) también detectaron distintos niveles de linfopenia en ganado infestado por *H. lineatum*.

Asimismo, Romero (2010) señaló que la presencia de L-1 de *O. ovis* estimulaba la producción de linfocitos, mientras que el desarrollo de L-2 y L-3 en el interior de las cavidades y senos nasales de las ovejas ocasionaba un descenso significativo.

### • **Monocitos**

Los monocitos son los leucocitos de mayor tamaño (15-20  $\mu\text{m}$ ) que se generan en la médula ósea y mediante la circulación (24 horas) llegan a diferentes órganos como hígado, bazo, pulmones, ganglios linfáticos, hueso, cavidades serosas, etc., donde se diferencian rápidamente como macrófagos. Su principal función es la de fagocitar microorganismos o restos celulares, teniendo en cuenta la presencia de antígenos. Su acción es inhibida mediante el reconocimiento de proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad presentes en las membranas celulares (tejido propio del organismo).

En nuestro estudio los monocitos (incluyendo parte de los eosinófilos) fueron las poblaciones leucocitarias menos numerosas en los tres grupos de animales (Figura 3.9). En el caso de los terneros, los monocitos fueron menos frecuentes que en los animales adultos, en los que se obtuvieron cifras muy similares en los animales negativos a la detección de L-1 de *Hypoderma lineatum* ( $2,1 \pm 1,6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) y en los positivos ( $2,1 \pm 1,6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ).



**Figura 3.9.- Recuento de monocitos circulantes en los tres grupos de animales**

El ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de monocitos entre los tres grupos de animales ( $F = 12,008$ ;  $p < 0,001$ ). Mediante la prueba de Boferroni se detectaron recuentos de monocitos significativamente menores en los terneros respecto de los adultos infestados ( $P < 0,001$ ) y no infestados ( $P < 0,001$ ).

Estos valores sobrepasaron las cotas fisiológicas descritos por Duncan y Prasse (1986) para ganado vacuno, que fueron establecidos por estos autores entre los 25 y 850 monocitos  $\text{ml}^{-1}$  o entre el 2 y el 8% de los leucocitos totales (Rosenberger, 1990).

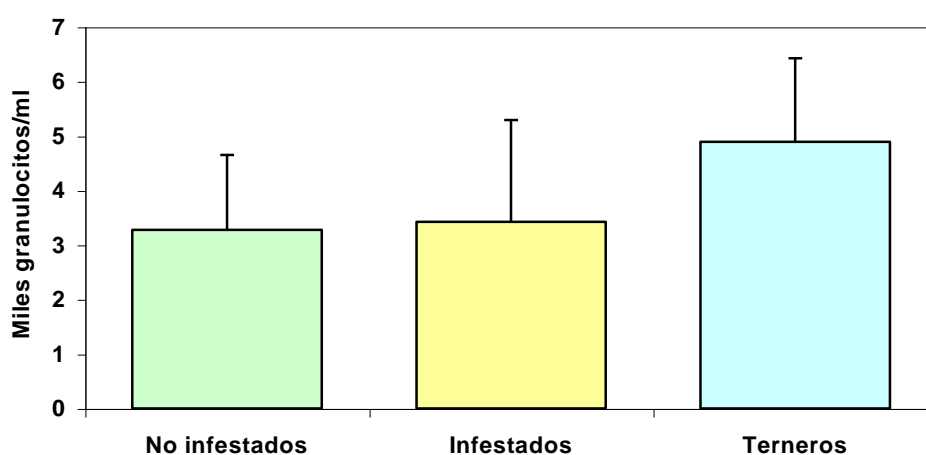
Hay que destacar que en la bibliografía consultada apenas hay referencias sobre las variaciones de los monocitos en animales con miasis u otras ectoparasitosis. Entre las escasas referencias destaca la de Romero (2010) quien al estudiar la respuesta leucocitaria en ovejas parasitadas por *Oestrus ovis* observó que los niveles de monocitos eran menores en los animales parasitados.

### ● **Granulocitos**

Los granulocitos o leucocitos polimorfonucleares se caracterizan por la presencia de gránulos citoplasmáticos, y se agrupan en tres tipos en función de la tinción de Wright:

neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos son la población más abundante, se originan en la médula ósea y su liberación a la sangre está regulada por diversas interleuquinas. Su función principal es la de intervenir en la inmunidad inespecífica, fagocitando partículas extrañas al organismo. Los eosinófilos pueden regular la respuesta alérgica y las reacciones de hipersensibilidad mediante la neutralización de la histamina, y a su vez producir un factor inhibidor de la degranulación de las células cebadas o de los basófilos, que también contienen sustancias vasoactivas. Los basófilos y eosinófilos tienen gran importancia en las infecciones parasitarias.

Las cifras de granulocitos (Figura 3.10) fueron similares en los dos grupos de vacas adultas ( $3,4 \pm 1,9 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  en las infestadas y  $3,3 \pm 1,4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  en las no infestadas); mientras que en los terneros se obtuvieron recuentos más altos de granulocitos. No obstante, mediante análisis ANOVA no se detectaron diferencias significativas en los recuentos de granulocitos de los distintos grupos.



**Figura 3.10.- Recuento de granulocitos circulantes en los tres grupos de animales**

En todos los grupos de animales, los niveles de granulocitos se encontraban dentro de los márgenes considerados normales por Rosenberger (1990) para el ganado vacuno ( $3$  a  $9 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ).

Los eosinófilos son los granulocitos más estudiados en relación con la respuesta inmune frente a *Hypoderma* spp. y otras artopodosis. Panadero (1996) comprobó, en un estudio llevado a cabo en Galicia, que las cifras de eosinófilos en animales infestados eran

reducidas durante la permanencia de las L-1 en el esófago. De acuerdo con Doby y col. (1987b) la eosinofilia se mantiene elevada mientras las larvas ejercen su actividad secretora, durante la migración a través de los tejidos del hospedador, volviendo a la normalidad cuando ésta cesa, es decir, durante la permanencia de las L-1 en los lugares de reposo.

En otra miasis, Romero (2010) comprobó que los animales parasitados por L-1 de *Oestrus ovis* presentaban niveles inferiores de granulocitos, respecto de los no parasitados.

### 3.3.3.- DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE SUPERFICIE CD2, CD4 y CD8 EN LINFOCITOS CIRCULANTES DURANTE LA FASE ESOFÁGICA DE *H. lineatum*

#### 3.3.3.1.- Linfocitos T (CD2<sup>+</sup>)

Como se puede observar en la figura 3.11, el porcentaje de linfocitos que presentaban en su superficie la proteína de membrana CD2 (linfocitos T maduros) fue bastante similar en los 3 grupos de animales; lo que se corroboró con el análisis de varianza que no reveló diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T maduros en los distintos grupos de animales.

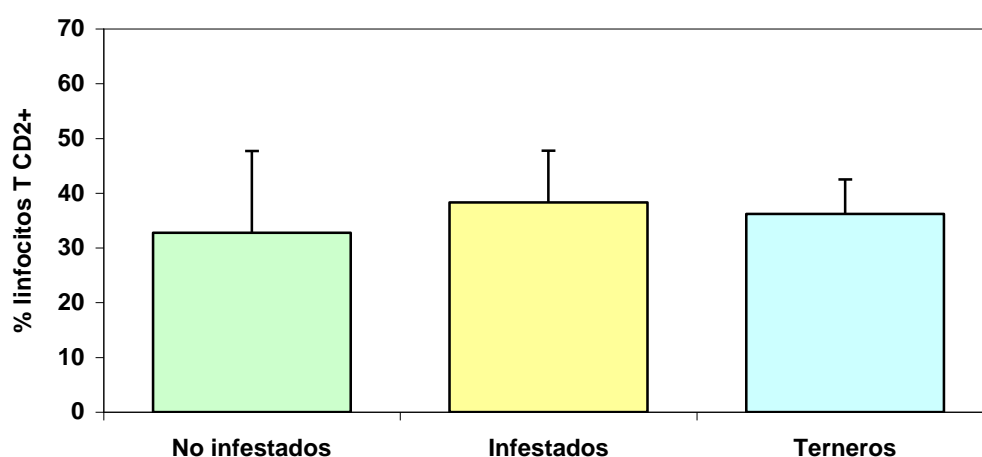


Figura 3.11.- Porcentaje de linfocitos T CD2<sup>+</sup> circulantes en los tres grupos de animales

Los valores de linfocitos T maduros estuvieron por debajo de los considerados fisiológicos por Park y col. (1992), quienes observaron en vacas adultas porcentajes de linfocitos T CD2<sup>+</sup> que oscilaban entre el 45,2% y el 52,5%. Otros autores, como Davis y col. (1988) incluso consideraron como normales los valores que oscilaban entre el 46% y el 75%.

En un trabajo realizado en ganado vacuno infestado por piojos (*Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus*), Milnes y col. (2007) observaron que el número de linfocitos CD2<sup>+</sup> en la piel de los animales infestados era significativamente superior al de los no infestados.

### 3.3.3.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>)

Dentro de los linfocitos T diferenciamos dos subpoblaciones, los CD4<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup>. La expresión de la proteína de membrana CD4, correspondiente a los linfocitos T colaboradores (Figura 3.12) se detectó en porcentajes similares en los animales adultos, tanto infestados como no infestados mientras que la presencia de estos linfocitos T colaboradores fue menor en los terneros. Sin embargo con el test ANOVA no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T colaboradores en los distintos grupos de animales.

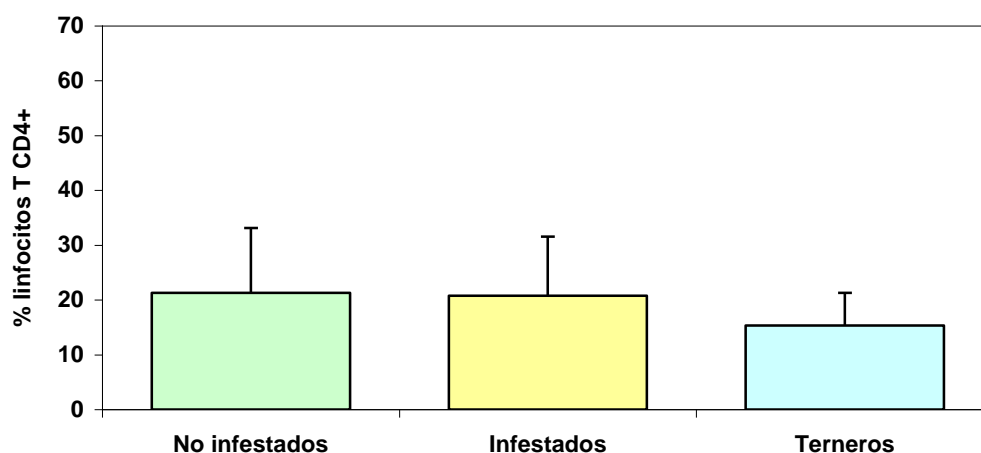


Figura 3.12.- Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes en los tres grupos de animales

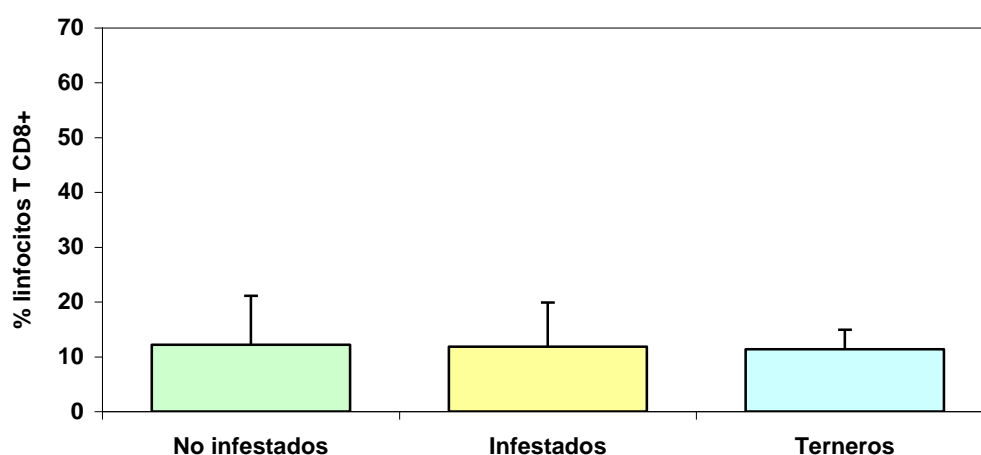
Las células T CD4<sup>+</sup> se encuentran habitualmente implicadas en la respuesta inmune frente a las miasis cutáneas, como la provocada por *Lucilia cuprina* (Broadmeadow, 1984; Bowles y col., 1992). De acuerdo con McElroy y col. (1998), los parásitos que invaden a su hospedador por vía cutánea provocan un rápido reclutamiento de células CD4<sup>+</sup>, lo que podría originar la disminución de sus niveles en sangre. De este modo, en nuestro estudio



los porcentajes de CD4<sup>+</sup> en los animales adultos fueron inferiores a los determinados como fisiológicos (23-37,7%) por diversos autores (Baldwin y col., 1986; Park y col., 1992 y Sopp y Howard, 2001).

### 3.3.3.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)

Estos linfocitos son los encargados de lisar células que expresan antígenos extraños al organismo y de ahí que sean útiles en la eliminación de microorganismos que infectan y viven en el interior de los distintos tipos de células. Los linfocitos citotóxicos, caracterizados por la expresión de la proteína CD8 en su superficie, mostraron porcentajes muy similares en los tres grupos de animales (Figura 3.13) y con análisis de varianza se comprobó que no existían diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T citotóxicos entre los distintos grupos de animales.



**Figura 3.13.- Porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes en los tres grupos de animales**

Al igual que ocurrió con los CD4<sup>+</sup>, los porcentajes de CD8<sup>+</sup> observados en nuestro estudio fueron inferiores a los detectados por Park y col. (1992) y Sopp y Howard (2001). No obstante, de acuerdo con Wijngaard y col. (1992) los valores obtenidos en nuestro estudio se encontrarían dentro de la normalidad ya que, en vacas adultas, se consideran normales porcentajes entre el 9% y 26%.

En otras parasitosis, como por ejemplo las provocadas por ácaros productores de sarna, van den Broek y col. (2005) comprobaron que las cifras de linfocitos CD8<sup>+</sup> eran muy reducidas.

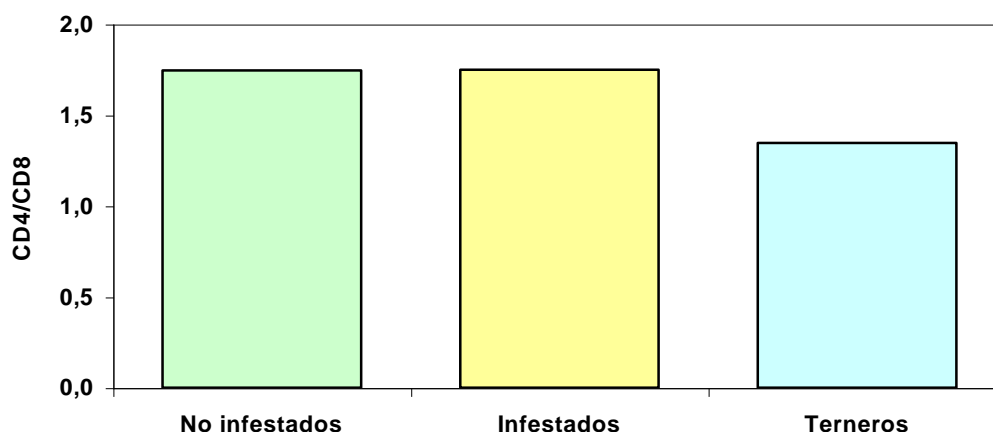
En la miasis causada por *Lucilia cuprina*, Bowles y col. (1994) señalaron que, en la infestación primaria, la respuesta se caracterizaba por una cifra baja de linfocitos citotóxicos, aunque experimentaban posteriormente un incremento, llegando incluso a superar a los linfocitos colaboradores.

Resultados similares obtuvieron Milnes y col. (2007) quienes, en un estudio en ganado vacuno infestado con *Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus*, vieron que los linfocitos citotóxicos no mostraban diferencias en los infestados respecto al grupo no parasitado. Por el contrario, en la infestación experimental de ratones con *Ixodes ricinus*, Mbow y col. (1994) observaron que en los infestados por primera vez, el número de células T CD8<sup>+</sup> superaba al hallado en los animales testigo; aunque su número era reducido y predominaban las células CD4<sup>+</sup>.

#### 3.3.3.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8

Para conocer mejor la respuesta inmune celular durante la fase esofágica de las L-1 de *Hypoderma lineatum*, resulta interesante estudiar la proporción de linfocitos citotóxicos y colaboradores. Para ello, calculamos el cociente CD4/CD8 en cada uno de los grupos y los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.14.

En todos los grupos de animales se observó un predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos. El cociente CD4/CD8 en los animales adultos fue igual (1,75 en ambos casos), mientras que en los terneros fue de 1,35.



**Figura 3.14.- Cociente de linfocitos T CD4/CD8 en los tres grupos de animales**

En nuestro estudio se repite este predominio de los linfocitos T colaboradores frente a los citotóxicos y, por lo general, el valor de este ratio se mantuvo dentro de los límites descritos por Park y col. (1992), quienes comprobaron que el ratio CD4/CD8 normal en bovinos adultos es de 1,52 (1,18-1,81).

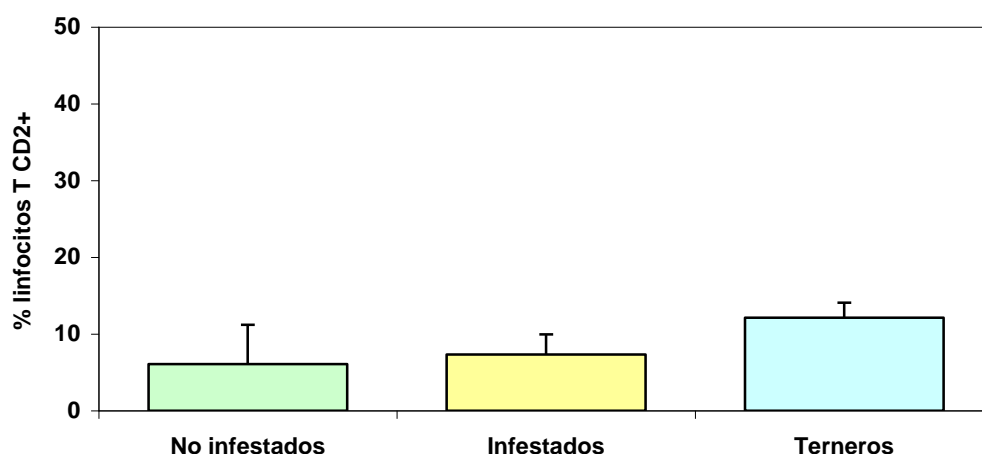
Al igual que en nuestro estudio, Dacal (2009) comprobó que durante la penetración de las L-1 de *Hypoderma lineatum* existía un claro predominio a nivel local de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos, lo que indicaría que tanto en el inicio de la respuesta inflamatoria como en el desarrollo de una respuesta adquirida frente al parásito participan fundamentalmente los linfocitos T colaboradores.

Durante la miasis provocada por *Lucilia cuprina*, Colditz y col. (1996) comprobaron que el cociente CD4/CD8 superaba la unidad, sugiriendo que la respuesta celular, y en concreto las poblaciones de linfocitos T, estaban implicadas en la respuesta frente a esta miasis en las ovejas resistentes. Del mismo modo, Milnes y col. (2007) en ganado vacuno infestado por piojos comprobaron que el cociente CD4/CD8 era siempre superior a la unidad.

### 3.3.4.- DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS MARCADORES DE SUPERFICIE EN LINFOCITOS OBTENIDOS DE GANGLIOS LINFÁTICOS

#### 3.3.4.1.- Linfocitos T (CD2<sup>+</sup>)

Como se puede observar en la figura 3.15, la proteína de superficie CD2 se expresa con más frecuencia en los linfocitos presentes en los ganglios mediastínicos de los terneros. Asimismo, en los animales adultos esta proteína aparece con mayor frecuencia en los animales positivos a la detección de L-1 en la submucosa esofágica.



**Figura 3.15.- Porcentaje de linfocitos T CD2<sup>+</sup> en ganglios linfáticos en los tres grupos de animales**

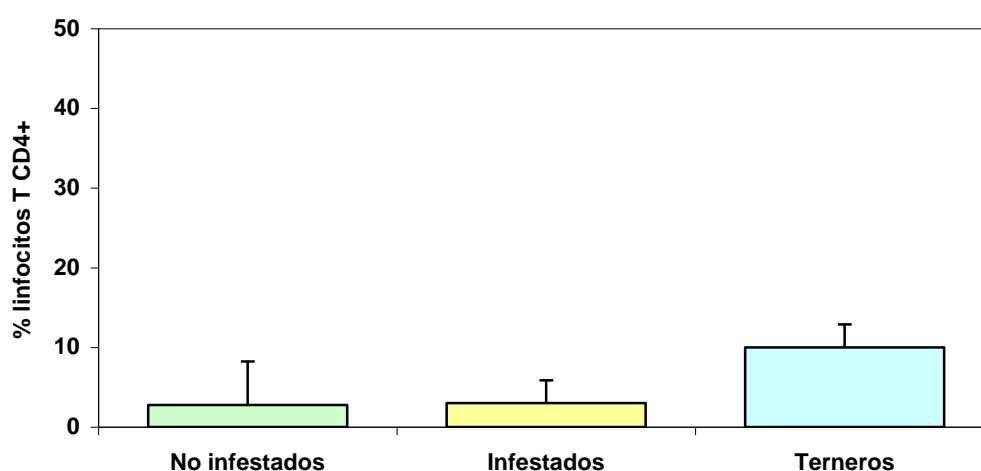
El análisis de varianza reveló que existían diferencias en el porcentaje de linfocitos T maduros entre los tres grupos de animales ( $F= 3,224$ ;  $P= 0,045$ ). Además, con la prueba de Bonferroni se comprobó que el porcentaje de linfocitos T maduros era significativamente menor en los animales adultos no infestados que en los terneros ( $P= 0,042$ ).

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el apartado anterior, vemos que el porcentaje de linfocitos CD2<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos es mucho menor que en la

sangre periférica, por lo que se puede concluir que no existe una relación entre los niveles de linfocitos CD2<sup>+</sup> periféricos y ganglionares, lo que sugiere que las diferencias en los valores sistémicos para este marcador, en particular, no se manifiestan de la misma forma “in situ”.

### 3.3.4.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>)

La proteína de superficie CD4 (Figura 3.16) se expresó con mayor frecuencia en los linfocitos presentes en los ganglios mediastínicos de los terneros, al igual que el receptor CD2. Por el contrario en las vacas adultas, el porcentaje de linfocitos T colaboradores fue muy similar en las positivas y en las negativas.



**Figura 3.16.- Porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ganglios linfáticos en los tres grupos de animales**

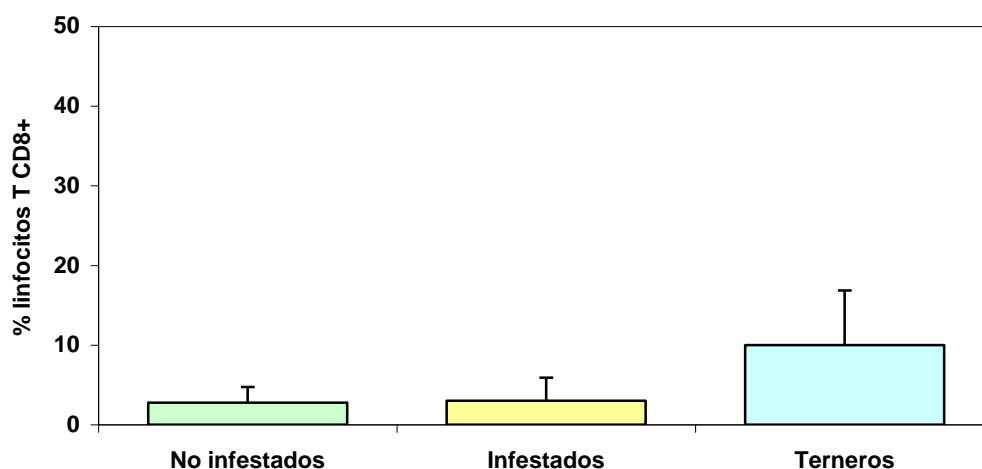
Mediante el test ANOVA comprobamos que existían diferencias en el porcentaje de linfocitos T colaboradores entre los tres grupos de animales ( $F= 17,779$ ;  $P< 0,001$ ). Además, con la prueba post-hoc de Bonferroni se comprobó que el porcentaje de linfocitos T colaboradores era significativamente mayor en los terneros respecto del grupo de las vacas adultas no infestadas ( $P< 0,001$ ) y de las infestadas ( $P< 0,001$ ).

En general el porcentaje de linfocitos colaboradores en los ganglios linfáticos es apreciablemente menor que en sangre periférica. Al igual que en caso anterior, no existe una relación entre los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre periférica y en ganglios, lo que sugiere que las oscilaciones en los valores sistémicos no se manifiestan de la misma forma *in situ* para este marcador en particular.

En un estudio realizado por Pérez y col. (2005) en corderos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*, determinaron que el infiltrado inflamatorio hepático estaba formado principalmente por linfocitos T CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> y que los cambios celulares en los ganglios linfáticos hepáticos consistían en un aumento de células CD4<sup>+</sup> sobre las CD8<sup>+</sup>.

#### 3.3.4.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)

En lo que respecta a los linfocitos T citotóxicos (Figura 3.17), la presencia de la proteína de superficie CD8 fue mayor en los terneros, mientras que en las vacas adultas los porcentajes fueron muy similares (infestadas y no infestadas). Mediante análisis de varianza se comprobó que estas diferencias entre los tres grupos de animales eran significativas ( $F=12,370$ ;  $P<0,001$ ). Además con la prueba post-hoc de Bonferroni se constató que el porcentaje de linfocitos T citotóxicos era significativamente mayor en los terneros respecto del grupo de adultos no infestados ( $P<0,001$ ) y de infestados ( $P<0,001$ ).



**Figura 3.17.- Porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ganglios linfáticos en los tres grupos de animales**

El porcentaje de linfocitos citotóxicos en los ganglios linfáticos de los animales adultos fue bastante más reducido que el hallado en la sangre, mientras que en los terneros fueron similares. Al igual que sucedió con los otros marcadores, no se halló relación entre los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre y en ganglios, lo que sugiere que las oscilaciones en los valores sistémicos no se manifiestan de la misma forma *in situ*.

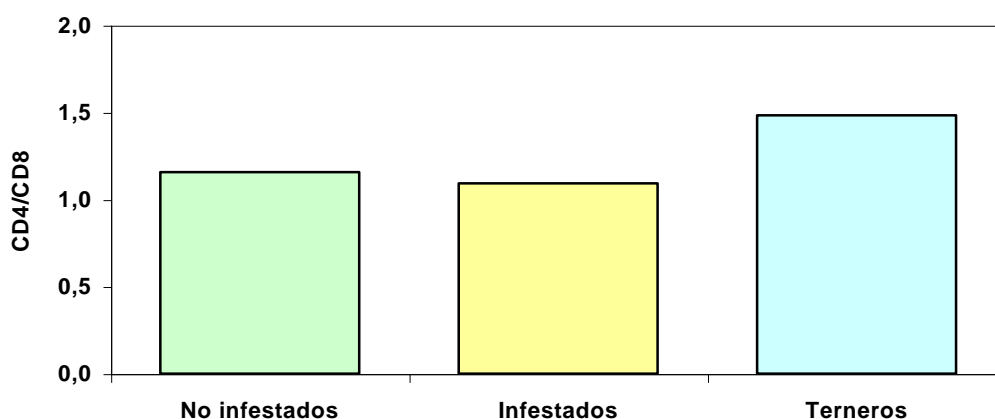
#### 3.3.4.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8

Adquiere gran importancia la proporción de linfocitos citotóxicos y colaboradores para conocer como se desarrolla la respuesta inmune celular frente a las L-1 de *Hypoderma lineatum* durante la fase esofágica. Por ello, calculamos el cociente CD4/CD8 y representamos los valores obtenidos en la figura 3.18.

Como se puede observar, en todos los grupos de animales hay predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos. En el caso de los adultos, el cociente fue próximo a la unidad, detectándose un ligero aumento de los linfocitos colaboradores en los animales que no presentaron L-1 en la submucosa, respecto de los que si las tenían.

Además, en ambos grupos se observó que el porcentaje de linfocitos colaboradores era menor que el obtenido en sangre periférica.

En el caso de los terneros, la respuesta celular se caracterizaba por una mayor proporción de los linfocitos colaboradores en los ganglios mediastínicos respecto a lo observado en los animales adultos. Asimismo, comprobamos que aumentaba el número de linfocitos colaboradores en los ganglios regionales respecto al observado en sangre periférica.

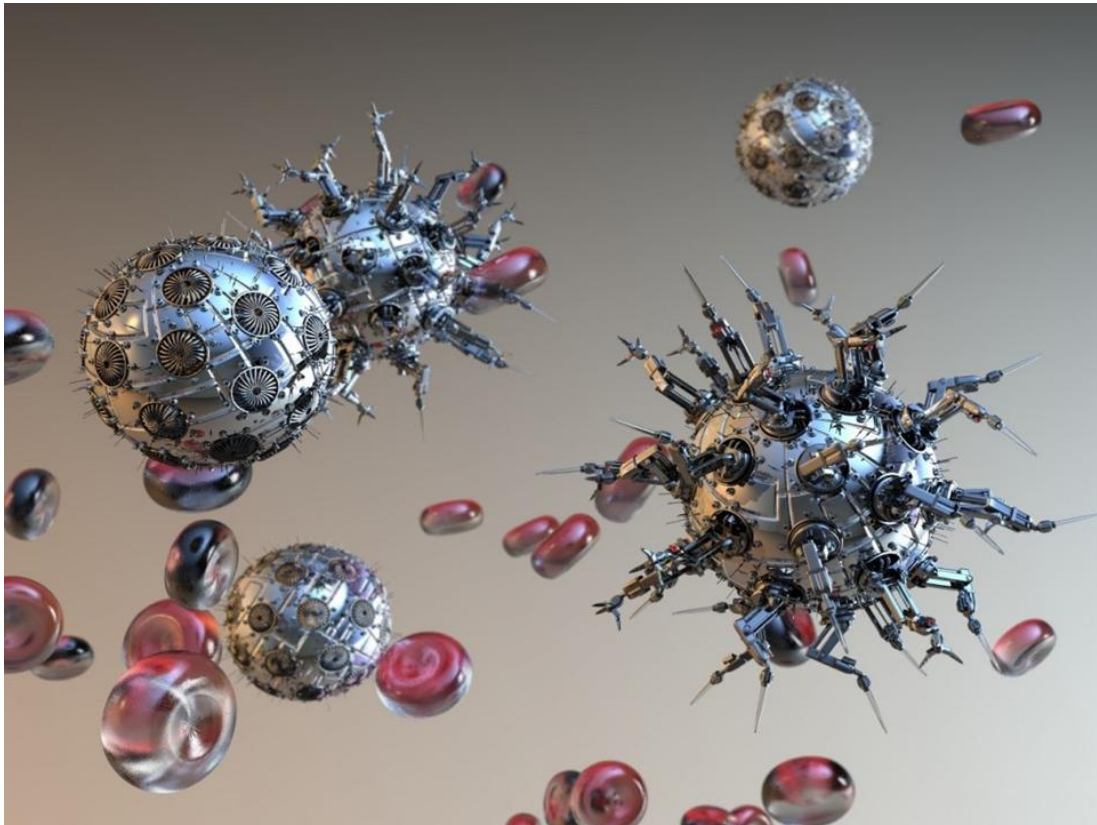


**Figura 3.18.- Cociente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en ganglios linfáticos**

Si comparamos la ratio CD4/CD8 hallada en los ganglios y en la sangre periférica comprobamos que en los ganglios es menor en los dos grupos de animales adultos, mientras que en los terneros fue similar.

El predominio de los linfocitos CD4<sup>+</sup> frente a los CD8<sup>+</sup> durante la fase esofágica de *H. lineatum* indicaría que durante este periodo, tanto las respuestas de tipo inflamatorio como la respuesta inmune adquirida dependen en gran medida de los linfocitos T colaboradores.





# **CAPÍTULO 2:**

## **RESPUESTA CELULAR Y HUMORAL EN GANADO VACUNO INFESTADO DE FORMA NATURAL POR *Hypoderma* spp.**





## **4.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**



La infestación por *Hypoderma* tiene lugar mediante la penetración activa de las larvas 1 a través de la piel del hospedador. Una vez que finaliza la entrada, las larvas comienzan su migración por el tejido subcutáneo que las llevará hasta la submucosa esofágica (*Hypoderma lineatum*) y la grasa epidural (*H. bovis*). Posteriormente, reinician la migración hacia el dorso del animal para formar los nódulos larvarios, también denominados “barros” o “bubones”.

Se ha comprobado que el ganado vacuno desarrolla cierta resistencia tras sucesivas infestaciones por larvas de *Hypoderma*, de modo que los animales más jóvenes presentan, en general, un número de nódulos larvarios superior a los de mayor edad (Gingrich, 1982). Además, Nelson y Weintraub (1972) señalaron que la respuesta celular estaba relacionada con la resistencia frente a *Hypoderma*, como lo demostraba la fuerte reacción celular producida tras la penetración de las larvas en animales reinfestados.

En la hipodermosis, la acción de las L-1 provoca una respuesta anticuerpo frente a los antígenos metabólicos que están constituidos esencialmente por los productos de secreción de sus glándulas salivales (Boulard, 1970). La respuesta humoral del hospedador es diferente según se trate de una primoinfestación o reinfestación (Colwell y Baron, 1990, Robertson, 1980, Panadero, 1996, Morrondo, 1998), aunque no se ha encontrado una relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia de los animales (Pruett y Barret, 1985, Panadero, 1996). El desarrollo por parte de los animales infestados de una respuesta humoral frente a esta miasis se ha observado en numerosos estudios, y se han puesto a punto diversas técnicas para detectar anticuerpos (Boulard y col., 1970; Boulard y Petithory, 1977; Robertson, 1980). No obstante, el principal problema asociado a estos métodos es la persistencia de los anticuerpos específicos incluso después de que todas las larvas hayan abandonado el hospedador o hayan sido destruidas por un tratamiento (Sinclair y col., 1984; Colwell y Baron, 1990). Para evitar este problema se ha desarrollado un ELISA sándwich o de captura para la detección del antígeno hipodermina C (Panadero y col., 2002) que detecta únicamente infecciones activas o muy recientes.

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas en respuesta a un estímulo inmune. Normalmente se encuentran en concentraciones muy bajas, aunque en ciertos casos pueden incrementarse notablemente los niveles en respuesta a determinadas agresiones. De igual forma que otros compuestos peptídicos, las citoquinas inician sus acciones mediante la unión a receptores de membrana específicos, lo que explica que se necesiten cantidades muy pequeñas para producir un efecto biológico (Abbas y col., 2002).

Las citoquinas secretadas a nivel local y en los nódulos linfáticos locales son recogidas por los plexos vasculares y, distribuidas vía sistémica, sirviendo como una señal temprana ante la que responde el sistema inmune del hospedador (Salmon y col., 1994).

En este capítulo nos propusimos estudiar, mediante citometría de flujo, hematología y enzimoimmunoensayo, la respuesta celular y humoral durante un ciclo completo de *Hypoderma* spp., empleando para ello animales infestados de forma natural en el pasto, planteándonos los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Estudiar la evolución del antígeno hipodermina C y de los anticuerpos circulantes (IgG totales, IgG1, IgG2 e IgM) en ganado vacuno primo y reinfestado de forma natural por *Hypoderma*.
- 2.- Determinar la evolución de las diferentes poblaciones leucocitarias y de los eritrocitos en sangre periférica.
- 3.- Estudiar la respuesta de los linfocitos T (CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), mediante citometría de flujo, a lo largo del ciclo de *Hypoderma*.
- 4.- Determinar los niveles séricos de las citoquinas: interleuquina 4, interleuquina 10, interleuquina 12, factor de necrosis tumoral e interferón gamma.
- 5.- Evaluar las variaciones en la cinética de la respuesta inmunitaria humoral y celular, y establecer su posible relación.



## **4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS**





#### 4.2.1.- ANIMALES EXAMINADOS Y DISTRIBUCIÓN DE LOS MUESTREOS

Los animales empleados en este estudio fueron 18 bovinos de aptitud cárnica de raza rubia gallega pertenecientes a un rebaño mantenido en régimen de pastoreo semiextensivo en el municipio de Sobrado dos Monxes (A Coruña). Esta granja presentaba un historial de hipodermosis, determinado mediante la detección de barro en el dorso en los años previos al inicio del estudio. En esta explotación se empleaba un programa de control parasitario, que no incluía el tratamiento frente a *Hypoderma*, consistente en la aplicación de tratamientos antiparasitarios semestrales, a base de bencimidazoles, frente a nematodos gastrointestinales y trematodos. No obstante, con el fin de descartar infecciones por otros parásitos internos, que pudieran interferir en nuestros resultados, en cada muestreo se tomaron muestras fecales al azar de 5 animales, para realizar los correspondientes análisis coprológicos.

Antes del comienzo del estudio (26 de abril de 2007) se tomaron muestras de sangre de todos los animales de la explotación mayores de 1 año para decidir, en función de los niveles de anticuerpos anti-*Hypoderma*, los que formarían parte del estudio. De este modo, se consideró que los animales que presentaban niveles elevados de anticuerpos se habían infestado en los meses precedentes al inicio del estudio.

Los animales se distribuyeron en tres grupos en función del número de infestaciones previas por *Hypoderma* spp.:

- G-0 (testigos): constituido por 4 terneros de aproximadamente 3 meses al inicio del estudio. Estos animales no habían salido al pasto desde su nacimiento y se mantuvieron confinados en el interior del establo, con lo que se evitó el contacto con el parásito. Debido al ciclo productivo de la granja, orientada a la producción de carne, estos terneros no pudieron permanecer en la explotación hasta el final del estudio, de modo que solo fue posible tomar muestras hasta diciembre de 2007. De este modo, se emplearon como valores basales de referencia, para cada parámetro evaluado, la media de estos animales durante los 8 primeros muestreos.

- G-1 (primoinfestados): compuesto por 7 novillas de aproximadamente un año al inicio del estudio. Estos animales habían salido por primera vez al pasto en la primavera de 2007, por lo que se consideró que en ese año habrían contactado por primera vez con las larvas de *Hypoderma* spp.
- G-2 (reinfestados): formado por 7 vacas de más de 24 meses de edad y que en los meses de enero y febrero de 2007 habían presentado barros en el dorso, y que por lo tanto presentaban al menos una infestación previa por *Hypoderma* spp.

Para este estudio, los muestreos se realizaron mensualmente, desde mayo de 2007 a mayo de 2008, ambos inclusive, periodo que se corresponde con un ciclo completo del parásito (Panadero, 1996; Panadero y col., 1998). De cada animal, se recogieron muestras de sangre en tubos Vacutainer® de 10 ml estériles y cerrados al vacío, con y sin anticoagulante (Imagen 18). Como anticoagulantes se emplearon ácido cítrico-dextrosa en las muestras destinadas a citometría de flujo y EDTA en las designadas a la realización del hemograma.



**Imagen 18.- Obtención de las muestras sanguíneas**

Asimismo, se realizó un recuento de los nódulos larvarios presentes en cada uno de los animales en la época correspondiente. Desde el momento en que se apreciaron los primeros nódulos larvarios, una vez al mes, y combinando la observación directa con la palpación del dorso de cada animal establecimos los periodos de aparición de éstos, así como su distribución en las distintas partes del dorso, ayudándonos de una plantilla en la que anotamos el número y localización de los nódulos (Imagen 19). Estos recuentos se

prolongaron hasta que, en dos muestreos consecutivos no se detectaban nódulos en el dorso.

Los resultados obtenidos en los recuentos se expresaron como intensidad de parasitación, entendiendo como tal la relación entre el número de barros y el número de animales parasitados.

Dos meses antes de finalizar el estudio (25 de marzo de 2008), fecha en la que todavía alguna L-3 se encontraba en el dorso, se aplicó a los animales de los grupos G-1 y G-2 un tratamiento que consistió en la administración subcutánea de ivermectina (Ivertin<sup>®</sup> inyectable, Laboratorios Calier, España), a la dosis recomendada de 0,2 mg/kg p.v. (equivalente a 1 ml /50 kg p.v.).

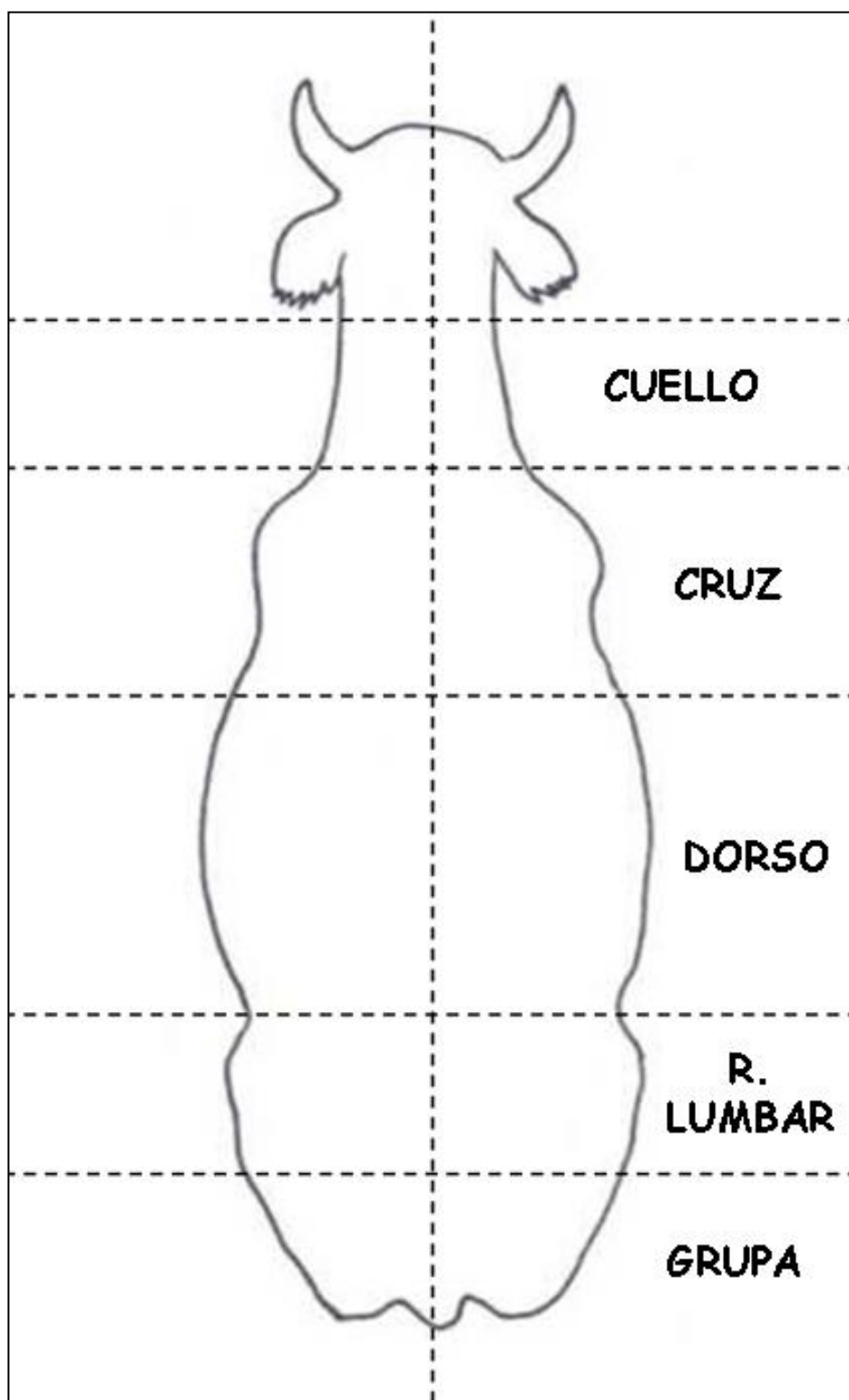


Imagen 19.- Plantilla empleada para anotar el número y localización de los nódulos larvarios

#### 4.2.2.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Una vez en el laboratorio, las muestras de sangre tomadas sin anticoagulante se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1-2 horas, tras lo cual se colocaron en el frigorífico a 4°C para facilitar la retracción del coágulo. Posteriormente, se extrajo el suero que se congeló a -20°C hasta su posterior empleo en el ELISA sándwich para la detección del antígeno circulante hipodermina C y en el ELISA indirecto para determinar los niveles de los distintos anticuerpos, siguiendo para ello los protocolos descritos en el capítulo 1. En este capítulo el suero se utilizó también en la detección de diferentes citoquinas implicadas en la respuesta inmune frente a *Hypoderma* spp., de acuerdo con el protocolo expuesto en el apartado siguiente.

Las muestras de sangre periférica recolectadas con ACD se procesaron mediante citometría de flujo para la detección de los antígenos linfocitarios CD3, CD4 y CD8, empleando anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína. El análisis se realizó en un citómetro de flujo Epics XL (Coulter Corporation, Miami, FL, USA) siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.3 del capítulo 1.

La determinación de los principales parámetros hemáticos se llevó a cabo en un contador hematológico tipo Abacus Junior Vet (Diatron LaB, Austria), a partir de la sangre recogida con EDTA.

#### 4.2.3.- PROTOCOLO DEL ELISA SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN DE IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ E IFN- $\gamma$

La evolución de las citoquinas circulantes se estudió mediante un ELISA sándwich que se detalla a continuación:

- **Sensibilización de las placas** de microtitulación de fondo plano (Nunc Maxisorb) con un anticuerpo primario monoclonal de ratón frente a IL-4/IL-10/IL-12/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  de bovino, todos ellos de Serotec (Reino Unido), a una concentración de  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  en tampón fosfato (PBS, pH 7,2) durante una noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con 200  $\mu\text{l}$  de PT (PBS + Tween 20). A continuación se bloquearon los puntos de unión inespecíficos durante 60 minutos en agitación a 20°C con 200  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato (PBS, pH 7,2) al que se le había añadido Tween 20 al 0,3% y BSA al 3% (tampón de dilución).

- **Adición de los sueros:** las muestras de suero problema, así como los sueros testigo positivo y negativo se emplearon a la dilución 1/1 en tampón de dilución y se depositaron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo. Cada suero se ensayó por duplicado y se consideró la media de ambos valores. Para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo específicos, la placa se incubó de nuevo, durante 1 hora a 20°C en agitación; transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con 200  $\mu\text{l}$  de PT.

Los sueros testigo positivo para cada una de las interleuquinas estudiadas procedían de animales que con anterioridad habían presentado nódulos larvarios en el dorso, y que mostraban niveles elevados para la interleuquina correspondiente, y los testigo negativos provenían de una población de sueros negativos, procedentes de animales jóvenes que nunca habían salido al pasto y que tenían niveles bajos para cada interleuquina.

- **Anticuerpo secundario biotinilado:** se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4/IL-10/IL-12/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  biotinilado (Serotec, Reino Unido) a la dilución 1/1000 en tampón de dilución. La dilución fue la misma para las distintas citoquinas. Tras incubar las placas durante 60 minutos a 20°C en agitación, se lavó 4 veces con PT.

- **Estreptavinida-peroxidasa** (Sigma-Aldrich, USA): este conjugado se empleó a la dilución 1/1000 en tampón de dilución. Las placas se incubaron durante 45 minutos a 20°C en agitación. Tras este tiempo se lavó 3 veces con PT y 2 con PBS.
- **Revelado de la reacción:** para valorar la actividad de la enzima peroxidasa empleamos OPD (Sigma). La dilución del sustrato se realizó en tampón citrato (pH 5) y agua oxigenada al 30%. Se depositaron 100 µl de esta dilución en cada pocillo y las placas se colocaron en un lugar oscuro durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción enzimática se detuvo añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 3N a cada pocillo. Posteriormente, las placas se dejaron en reposo, durante 5-10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La lectura de las densidades ópticas se realizó en un espectrofotómetro modelo 680-XR<sup>®</sup> de la firma Bio-Rad y con un filtro de 490 nanómetros.

#### **4.2.3.1.- Normalización de las absorbancias y cálculo de las concentraciones**

La normalización o estandarización de las absorbancias se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.8. del capítulo 1.

Una vez normalizadas las absorbancias, se calcularon las concentraciones (ng ml<sup>-1</sup>) de las distintas citoquinas en el suero, para ello se usaron curvas cuadráticas obtenidas con concentraciones conocidas de las distintas interleuquinas recombinantes de ganado bovino (rboIL-4, rboIFN-γ y rboTNF-α, Serotec) que actuaron como patrón.

En el caso de la IL-10 e IL-12, al no disponer de la interleuquina recombinante de bovino para emplear como patrón, los resultados se expresaron como valores normalizados de densidad óptica (490 nm).

#### 4.2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de los resultados se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 18.0.1. SPSS Inc, Chicago (2009).

El análisis estadístico comprendió la determinación de los parámetros descriptivos, media y desviación estándar, de las variables valoradas tanto en el estudio citométrico (marcadores CD2, CD4 y CD8 en los linfocitos), hematológico (linfocitos, monocitos y granulocitos) y mediante enzimoimmunoensayo (antígeno, inmunoglobulinas y citoquinas).

La evolución de las distintas poblaciones celulares, de los antígenos, inmunoglobulinas y citoquinas en los animales primo y reinfestados a lo largo del tiempo se analizó mediante la prueba de análisis de varianza de muestras repetidas, empleando el contraste repetido para comprobar si en las sucesivas muestras había diferencias significativas con respecto a la media de las muestras previas.

Se empleó la prueba de comparación múltiple post-hoc de Bonferroni para detectar posibles diferencias entre los animales primo y reinfestados en los sucesivos muestreos.





## **4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

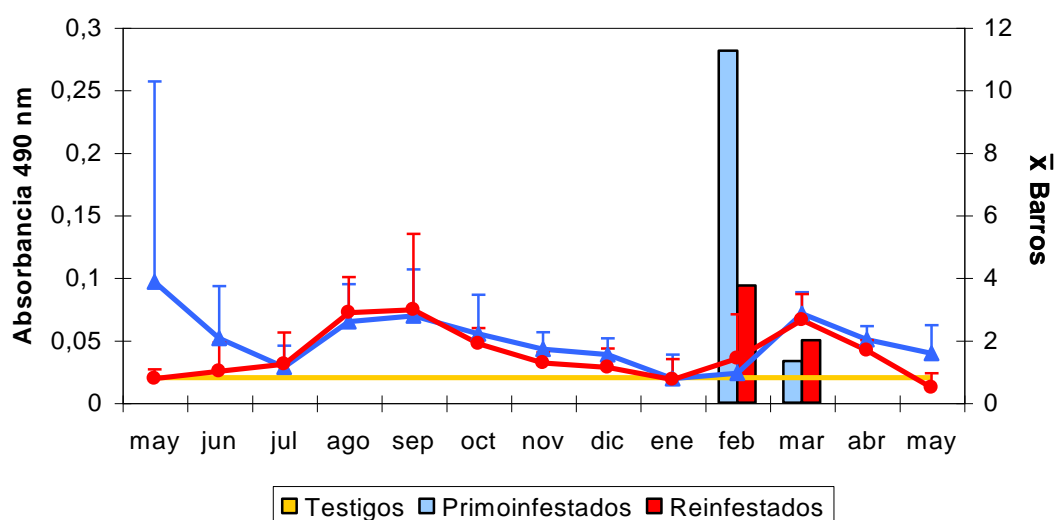


### 4.3.1.- EVOLUCIÓN DEL ANTÍGENO HIPODERMINA C Y DE LOS ANTICUERPOS CIRCULANTES EN EL CURSO DEL CICLO DE *Hypoderma*

#### 4.3.1.1.- Hipodermina C

En la figura 4.1 se muestra la evolución, durante un ciclo completo del parásito, de los niveles de hipodermina C circulante en el conjunto de los animales del estudio, así como su relación con la intensidad de parasitación.

Los valores normalizados de la DO de ambos grupos de animales infestados, que representan los niveles séricos de la HyC, no variaron considerablemente a lo largo del estudio, apreciándose un ligero aumento en agosto-septiembre y posteriormente en el mes de marzo. En los terneros no infestados, los niveles medios de DO fueron de  $0,02 \pm 0,017$ .



**Figura 4.1.- Variación de los niveles séricos de hipodermina C y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento significativo en los animales primoinfestados en los muestreos de los meses de agosto

( $F= 11,598$ ;  $P= 0,014$ ) y marzo ( $F= 92,886$ ;  $P< 0,001$ ), mientras que en el mes de abril se produjo un descenso significativo ( $F= 9,872$ ;  $P= 0,020$ ).

En los animales reinfestados se produjo un aumento significativo en el mes de agosto ( $F= 53,797$ ;  $P= 0,002$ ) y varios descensos significativos en los meses de noviembre ( $F= 11,529$ ;  $P= 0,027$ ), abril ( $F= 11,327$ ;  $P= 0,028$ ) y mayo ( $F= 43,460$ ;  $P= 0,003$ ).

Con la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre los animales primo y reinfestados, en los distintos muestreos.

De acuerdo con Panadero y col. (2002) y Colwell y col. (2003), la evolución de la hipodermina C guarda estrecha relación con las fases de desarrollo de las larvas 1. No obstante, se debe señalar que en condiciones naturales, como en las de este estudio, en el que el número de larvas infestantes puede llegar a ser muy variable y el desarrollo larvario no es sincrónico, la interpretación de los resultados es mucho más difícil y puede diferir considerablemente, de la que, según estos autores, se presenta en condiciones experimentales. Así las fases tempranas del ciclo, que incluyen desde la entrada de larvas hasta su llegada a los lugares de reposo en la submucosa esofágica, suponen un aumento moderado en los niveles de antígenos circulantes, ya que el tamaño de las larvas es pequeño y, por consiguiente, su contenido enzimático limitado. En nuestro caso, la migración y llegada de las larvas a los lugares de reposo supuso un aumento significativo en los niveles de HyC en ambos grupos de animales en el mes de agosto. En la siguiente fase, durante la cual las larvas migran desde los lugares de reposo hasta el tejido subcutáneo del dorso, el tamaño de las L-1 alcanza el máximo, pero es durante la muda a larvas 2 cuando se produce la liberación de grandes cantidades de HyC hacia los tejidos y a la circulación sanguínea. De acuerdo con Boulard (1969), tras la llegada de las L-1 al dorso de los animales, éstas mudan a L-2, estableciéndose una comunicación entre el intestino medio y posterior, lo que facilita la expulsión de grandes cantidades de antígenos, que cesa cuando todas las larvas pasan a L-2 y L-3. En los animales primoinfestados este aumento fue significativo en el mes de marzo, pero no en los reinfestados, siendo en estos últimos la intensidad de parasitación mucho menor. Por último, la destrucción de las últimas larvas debida al tratamiento supuso un descenso significativo en los valores de la DO en ambos grupos de animales.

Hemos de señalar que en nuestro estudio los niveles máximos de HyC circulante se detectaron durante la permanencia de las larvas en el dorso; sin embargo, Moirè y col. (1994) demostraron que la expresión génica de la HyC disminuye ostensiblemente o cesa en las dos últimas fases larvarias, debido a que en estas fases, las larvas se encuentran aisladas dentro de un nódulo que, en cierto modo las independiza del sistema inmune del animal.

Con respecto a la intensidad de parasitación, ésta osciló entre 1 y 30 nódulos larvarios por animal. Estas cifras son similares (1-41 barro/animal) a las observadas por Panadero (1996) en vacas frisonas de Mabegondo (A Coruña). Sin embargo, resultó inferior a las halladas (60 barro/animal) por Reina y col. (1994) y Díez y col. (1992) en bovinos de Extremadura y Lugo, respectivamente. Esta intensidad de parasitación puede considerarse moderada, teniendo en cuenta que los animales permanecieron todo el año en el pasto, lo que favorecía el posible contacto con las moscas. No obstante, según lo señalado por Weintraub y col. (1961), el número de larvas que alcanzan el dorso del animal es inversamente proporcional al número de larvas infestantes, es decir, que un número elevado de huevos depositados en los pelos de un animal no se correspondería con un mayor número de barro, debido a la intensidad de la respuesta inmune que destruiría un número considerable de larvas.

Por otra parte, la intensidad de parasitación (Figura 4.1) fue mayor en los bovinos primoinfestados (7 barro/animal, 1-30 barro). Por el contrario, en los animales reinfestados, que se encontraban como mínimo en su segundo año de pastoreo y que habían presentado barro el año anterior, detectamos un menor número de barro (3 barro/animal, 1-6 barro). Estos resultados indican que los animales reinfestados habrían desarrollado un cierto grado de resistencia adquirida como consecuencia de las infestaciones previas, ya que según Gingrich (1980), el ganado adquiere resistencia tras una o varias infestaciones, que se traduce por la destrucción de las larvas e impide su llegada al dorso. En este mismo sentido, Benakhla y col. (1993) detectaron porcentajes de parasitación más altos en vacas menores de tres años (75,6%) que en las que superaban esa edad (24,2%).

Como se puede observar en la figura 4.1, los primeros nódulos larvarios se apreciaron en febrero, alcanzándose en este mes las cifras máximas. En marzo su número disminuyó considerablemente. Es necesario señalar que la administración de un tratamiento

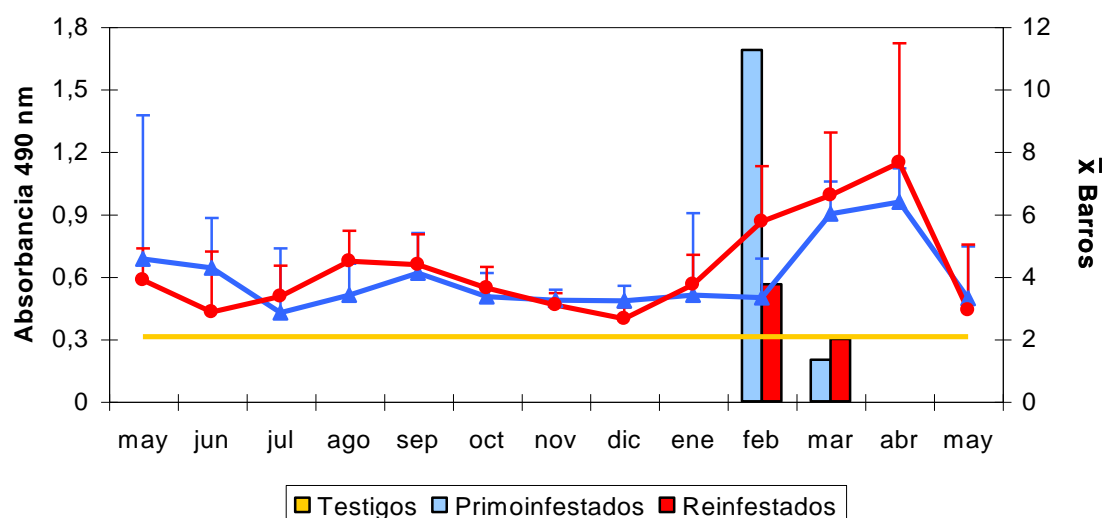
tardío con ivermectina, a finales de marzo, interrumpió el ciclo de *Hypoderma* en estos animales, por lo que no se observaron barros a partir de este momento. Los terneros del grupo testigo no presentaron barros debido a que, como señalamos anteriormente, no habían tenido oportunidad de entrar en contacto con la mosca. El periodo de aparición de los barros en los animales de este estudio fue similar al obtenido por Panadero (1996) quien, en una zona muy próxima de la provincia de A Coruña, comprobó que el mayor número de nódulos larvarios se observaban entre enero y marzo, si bien estos periodos podrían variar de un año a otro, en función de las condiciones climáticas.

#### 4.3.1.2.- Inmunoglobulinas G totales

En la figura 4.2 aparece representada la evolución de los anticuerpos específicos anti-HyC en animales primo y reinfestados por *Hypoderma*; ambos grupos presentan una evolución similar. Así, las vacas que se encontraban en su primera temporada de pastoreo al comienzo del estudio presentaban niveles elevados de anticuerpos que comenzaron a disminuir hasta el mes de julio, momento a partir del cual se elevaron nuevamente, posiblemente debido a una nueva infestación. De nuevo, durante la permanencia de las larvas en los lugares de reposo, los anticuerpos se mantuvieron en niveles relativamente bajos. Con la reactivación larvaria, los anticuerpos se elevaron de nuevo a partir de enero, coincidiendo con la aparición de los primeros nódulos larvarios, y sus niveles permanecieron elevados hasta abril.

Asimismo, se observó que en los animales reinfestados los niveles de anticuerpos se mantuvieron relativamente elevados en agosto-septiembre; a partir de ahí y posiblemente coincidiendo con la permanencia de las L-1 en los lugares de reposo, las absorbancias fueron bajas y se incrementaron progresivamente a partir de enero, coincidiendo con la aparición de los primeros bubones en el dorso, y de nuevo los niveles de anticuerpos permanecieron elevados hasta abril.

Finalmente, en los animales no infestados, los valores de DO fueron de  $0,31 \pm 0,149$ .



**Figura 4.2.- Evolución de los niveles séricos de IgG totales y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento significativo en los animales primoinfestados en el mes de marzo ( $F= 22,318$ ;  $P= 0,003$ ) y un descenso en la toma del mes de mayo ( $F= 37,233$ ;  $P= 0,001$ ). En los reinfestados se produjo un aumento y un descenso significativo, en el mes de agosto ( $F= 13,481$ ;  $P= 0,021$ ) y mayo ( $F= 13,689$ ;  $P= 0,021$ ), respectivamente.

Mediante la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias significativas entre los niveles de inmunoglobulinas G totales entre los distintos grupos.

La evolución de los anticuerpos circulantes en una población de ganado vacuno infestado de forma natural por *Hypoderma* se caracteriza por una marcada variabilidad individual. No obstante, cuando se consideran todos los animales en conjunto, la cinética de títulos de anticuerpos sigue una curva ascendente que se repite cada vez que se inicia el ciclo interno del parásito (Boulard, 1975), como hemos observado en el presente estudio.

Al igual que afirmaron Pruett y Barrett (1985) y Vázquez (2005) hemos constatado que tras la infestación del ganado los niveles de anticuerpos suelen aumentar, coincidiendo con la migración de las larvas hacia los lugares de reposo invernal, y se mantienen relativamente estables durante su estancia en ellos, para volver a incrementarse cuando las

larvas migran hacia el dorso del animal; descendiendo finalmente con la formación de los nódulos larvarios; existiendo así una relación entre la evolución de los anticuerpos y las distintas fases de desarrollo de *Hypoderma* spp.

La caída rápida de los títulos de anticuerpos coincidiendo con el abandono de las larvas de los barros, implicaría que la respuesta positiva de los anticuerpos, detectada en estos meses, se debería a las nuevas infestaciones del ganado, y no a la persistencia de títulos residuales procedentes de la infestación anterior, como sugieren Sinclair y col. (1984) y que nosotros hemos observado en nuestro estudio en los meses de abril y mayo. No obstante, Colwell y Baron (1990) señalaron que, mientras en animales con infestaciones ligeras (1-4 barros) la producción de anticuerpos cesa cuando se desprenden las últimas larvas, en los que están intensamente parasitados, la respuesta anticuerpo persiste durante más tiempo. Así, Sinclair y col. (1984) todavía detectaron anticuerpos residuales a las 14 semanas del final de la infestación.

En los bovinos jóvenes primoinfestados, nuestros resultados coinciden en general con los de Robertson (1980), Gingrich (1982) y Baron y Colwell (1991), quienes señalaron que, en estas condiciones, la respuesta antigénica es más lenta. Pruett y Barrett (1984) y Pruett y col (1987) comenzaron a detectar IgG específicas frente a antígenos de las larvas de *H. lineatum* a partir de las 4-6 semanas postinfestación en animales primoinfestados, comprobando que las respuestas se intensificaban progresivamente durante 3-4 semanas, para posteriormente descender ligeramente.

No obstante, en otro estudio realizado por Panadero (1996), se comprobó que en la respuesta inmune frente a infestaciones naturales por *Hypoderma* spp., no se observaban diferencias respecto al momento de la elevación de los anticuerpos, aunque esta posible discrepancia se pudiera deber a la escasa diferencia de edad entre los distintos grupos de animales utilizados en el ensayo. Asimismo en ese estudio, la autora observó títulos más bajos de anticuerpos en los bovinos reinfestados, lo que no coincide con los resultados de este estudio.

Asimismo, Barral (2000) comprobó que los niveles de IgG aumentaban tras el reinicio de la migración larvaria desde el esófago al dorso y descendían a medida que iban disminuyendo los barros del dorso del animal, situación similar a la observada en los animales infestados de este estudio.



Nuestros resultados también coinciden con los de Panadero y col. (2001), quienes observaron que los niveles de IgG se mantenían constantes durante la permanencia de las L-1 en el esófago. Asimismo, también comprobaron que dichos niveles de IgG se elevaban considerablemente cuando las larvas reiniciaban su migración hacia el dorso y se reducían tras abandonar las L-3 los barros.

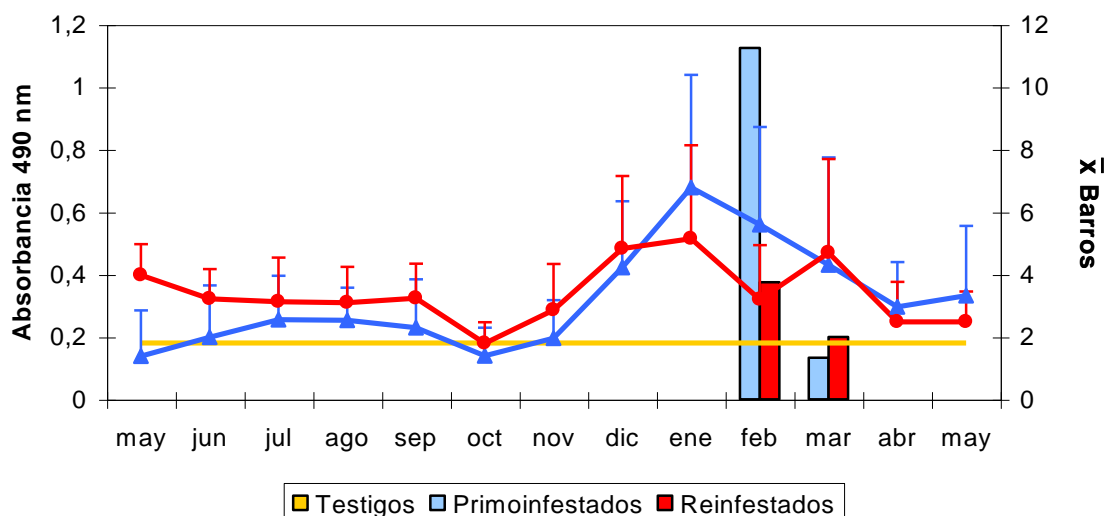
Al igual que sucede en otras parasitosis, como la provocada por *Oestrus ovis* en ovejas, el metabolismo activo de las larvas se asocia con la producción de IgG, con un descenso de los niveles de IgG durante la diapausa (Dorchies y col., 1998; Goddard y col., 1999; Suárez y col., 2005; Romero y col., 2010).

#### 4.3.1.3.- Inmunoglobulinas G, subclase 1

En la figura 4.3 se muestra la evolución de los niveles de IgG1 durante un ciclo de *Hypoderma* spp. en vacas que pastaban en una zona donde la hipodermosis es habitual, así como su relación con la época de aparición y el número de barros observados en los animales.

En los animales primoinfestados y en los reinfestados, las densidades ópticas alcanzaron valores máximos en enero ( $0,678 \pm 0,300$  en primoinfestados y  $0,515 \pm 0,012$  en reinfestados) coincidiendo, en ambos casos, con el inicio de la migración de las larvas hacia el dorso de los animales. A partir de este momento, y durante la permanencia de las larvas en el tejido subcutáneo, los niveles de IgG1 disminuyeron. Los niveles más bajos se detectaron durante la estancia de las larvas en los lugares de reposo, durante el mes de octubre ( $0,139 \pm 0,067$  en primoinfestados y  $0,180 \pm 0,095$  en reinfestados).

Finalmente, en los animales no infestados los valores de la DO fueron de  $0,18 \pm 0,162$ .



**Figura 4.3.- Evolución de los niveles séricos de IgG1 y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró tres aumentos significativos consecutivos en los animales primoinfectados en los meses de noviembre ( $F= 7,278$ ;  $P= 0,036$ ), diciembre ( $F= 17,412$ ;  $P= 0,006$ ) y enero ( $F= 11,906$ ;  $P= 0,014$ ). En el caso de los reinfestados se detectó un descenso en octubre ( $F= 9,425$ ;  $P= 0,015$ ) seguido por un aumento en diciembre ( $F= 16,617$ ;  $P= 0,015$ ).

Con la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre los animales primo y reinfestados.

Nuestros resultados coinciden con los de Panadero y col. (2001) quienes, en un estudio similar realizado con vacas frisonas, comprobaron que los niveles de IgG1 se mantenían constantes durante la permanencia de las L-1 en el esófago, elevándose tras el reinicio de la migración hacia el dorso y finalmente se reducían tras abandonar las L-3 los barros. En nuestro estudio, los animales primoinfectados alcanzaron niveles incluso más elevados que los reinfestados.

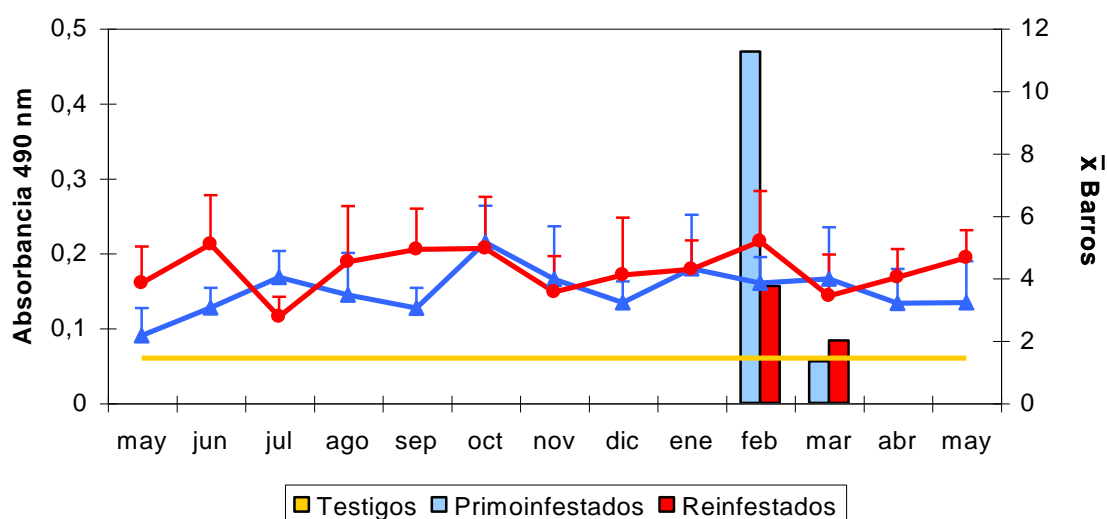
En otro estudio sobre la evolución de los títulos de anticuerpos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c) en ratas infectadas por *Fasciola hepatica*, Paz y col. (1998) observaron un aumento de las distintas inmunoglobulinas en las primeras semanas postinfección.

#### 4.3.1.4.- Inmunoglobulinas G, subclase 2

En la figura 4.4 se observa que las vacas primoinfectadas al comienzo del estudio presentaban niveles bajos de IgG2 que aumentaron rápidamente, alcanzando dos máximos en los meses de julio y octubre; a partir de este momento se mantuvieron más o menos constantes hasta el final del estudio.

De la misma forma, en los animales reinfestados se comprobó que los niveles de IgG2 alcanzaron un máximo en el mes de junio y se mantuvieron relativamente elevados en coincidencia con la estancia de las L-1 en los lugares de reposo. A partir de enero, coincidiendo con la aparición de los primeros bubones en el dorso, los niveles de esta inmunoglobulina se incrementaron de nuevo.

Finalmente, en los animales no infestados los valores de DO ( $0,06 \pm 0,025$ ) estuvieron siempre por debajo de los otros grupos.



**Figura 4.4.- Evolución de los niveles de IgG2 y su relación con la presencia de nódulos larvares**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento en los animales primoinfectados en las tomas de junio ( $F= 51,734$ ;  $P< 0,001$ ), julio ( $F= 16,361$ ;  $P= 0,007$ ) y octubre ( $F= 14,912$ ;  $P= 0,008$ ). Igualmente en este grupo se produjo

un descenso en la toma de noviembre ( $F= 10,762$ ;  $P= 0,017$ ). En el grupo de los reinfestados se produjo un aumento al inicio del estudio, en el mes de junio ( $F= 10,945$ ;  $P= 0,030$ ) y dos descensos en los meses de julio ( $F= 9,480$ ;  $P= 0,037$ ) y noviembre ( $F= 16,352$ ;  $P= 0,016$ ).

Con la técnica posthoc Bonferroni se observaron diferencias entre los animales primo y reinfestados en los meses de julio ( $P= 0,001$ ), agosto ( $P= 0,017$ ), octubre ( $P= 0,031$ ) y marzo ( $P= 0,032$ ).

En nuestro estudio observamos una elevación temprana en los niveles de estas inmunoglobulinas que fue significativa en el mes de junio, coincidiendo con la llegada de las larvas a los lugares de reposo, mientras que las IgG1 se elevaron de forma significativa durante la movilización de las larvas hacia el dorso. Estos resultados contrastan con los de Panadero y col. (2001) quienes, en un estudio similar en vacas frisonas, comprobaron que los niveles de IgG2 seguían un patrón paralelo a las IgG1, manteniéndose constantes durante la permanencia de las L-1 en el esófago para elevarse tras el reinicio de la migración hacia el dorso y reduciéndose tras abandonar las L-3 los barros. Las discrepancias observadas en ambos estudios podrían deberse a que ambos fueron realizados en ganado infestado naturalmente, en los que las cargas parasitarias son difíciles de establecer y las migraciones larvarias no suelen ser sincrónicas, pudiendo coincidir, en un determinado momento larvas en distintas fases de desarrollo.

De acuerdo con nuestros resultados, la infección por *Hypoderma* spp indujo una respuesta inmunitaria muy intensa, caracterizada por una elevación inicial de las IgG2 relacionadas con una respuesta de tipo Th2 que sería seguida de una fase en la que predominaron las IgG1 más características de una respuesta Th1.

Nuestros resultados coinciden con los de McKeand y col. (1996) quienes comprobaron en terneros infectados o vacunados contra *Dictyocaulus viviparus* que la respuesta IgG2 precede a otra predominante de tipo IgG1.

No obstante, Phiri y col. (2006) en ganado ovino y vacuno infectado por *Fasciola* spp. observaron una importante respuesta IgG2, aunque esta fue más tardía que la constituida por IgG totales e IgG1.

Finalmente, Bossaert y col. (2000) asociaron la presencia de ambos isotipos de IgG con la patogenicidad de dos especies de *Fasciola*, de modo que en los animales infectados con *F. hepatica*, especie menos patógena, había una fuerte respuesta IgG2, mientras que en los infectados por *F. gigantica*, más patógena, había una respuesta IgG2 muy débil. En este mismo sentido, Mulcahy y col. (1998) comprobaron que una elevación de las IgG2 se asocia con la protección frente a *F. hepatica*. De acuerdo con estos autores, los niveles más elevados registrados por los animales re infectados en comparación con los primoinfectados podrían estar implicados en la aparición de resistencia frente a este parásito. Asimismo, Paz y col. (1999) estudiaron los niveles de las subclases IgG en ratones re infectados con *F. hepatica*, observando un predominio de la subclase IgG1 en el grupo re infectado a las 4 s.p.i. y de las IgG2 en el grupo re infectado a las 11 s.p.i., concluyendo que la presencia de fases juveniles o adultas en el hígado, en el momento de la re infección, influye en la respuesta inmunitaria.

#### 4.3.1.5.- Inmunoglobulinas M

En el grupo de los animales primoinfectados los niveles medios de inmunoglobulinas M se mantuvieron en general constantes a lo largo del ciclo, excepto por dos ligeras elevaciones en noviembre y febrero (Figura 4.5).

En los re infectados el comportamiento fue bastante similar al grupo anterior, de modo que tras el reinicio de la migración de las L-1 hacia el dorso, los niveles de esta inmunoglobulina aumentaron. Asimismo, con la desaparición de los barros del dorso, los niveles séricos de IgM descendieron nuevamente.

Finalmente, en los animales no infestados, se observaron niveles de DO de  $0,11 \pm 0,046$ .

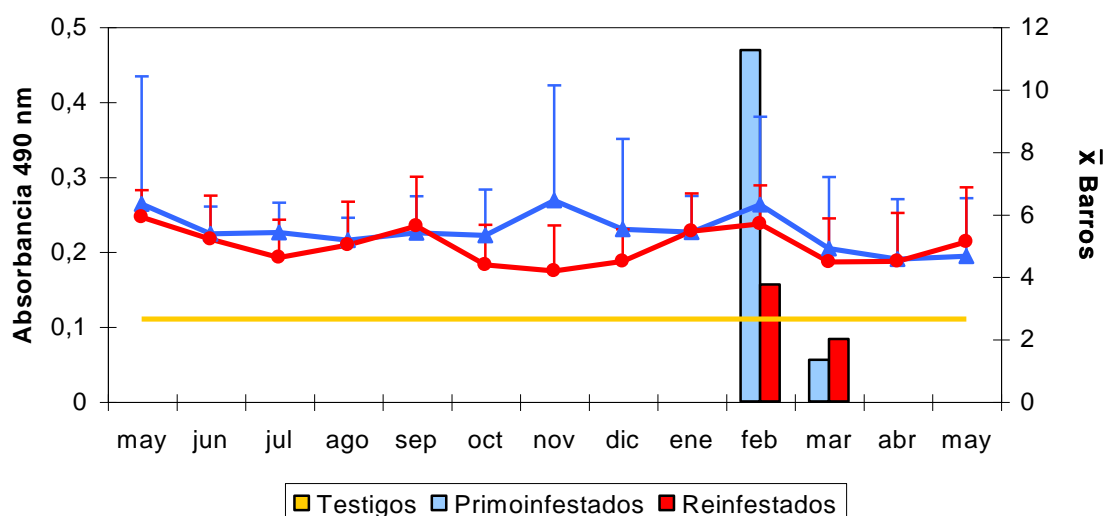


Figura 4.5.- Evolución de los niveles medios de IgM y su relación con la presencia de nódulos larvarios

Mediante la prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido no se hallaron diferencias significativas con respecto a los muestreos previos en el grupo de los animales primoinfectados. Esta misma prueba mostró un aumento significativo en los animales reinfestados en la toma del mes de septiembre ( $F= 20,658$ ;  $P= 0,010$ ) y en la de mayo ( $F= 36,150$ ;  $P= 0,004$ ), mientras que el único descenso significativo se produjo en la toma del mes de marzo ( $F= 28,440$ ;  $P= 0,006$ ).

Mediante la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre los animales primo y reinfestados.

Esta falta de diferencias coincide con estudios previos (Barral, 2000; Panadero y col., 2001) en los que los niveles de este anticuerpo apenas variaban a lo largo del ciclo de *Hypoderma* spp. y ni siquiera se veían modificados tras la aplicación de un tratamiento temprano.

Phirri y col. (2006) observaron que tras la infestación con *Fasciola* spp. las inmunoglobulinas M fueron las que más precozmente se elevaron y se mantuvieron en niveles relativamente altos hasta el final del estudio en los animales infectados, al igual que ocurre en este ensayo. Asimismo, Serrano y col. (1999) no encontraron una modificación en la producción de IgM específicas frente a *Fasciola hepatica* como respuesta a reinfecciones,

por lo que los niveles de este isotipo no estarían condicionados por contactos previos de los animales con el parásito.

Según Suárez y col. (2005) y Romero y col. (2010) la presencia de L-1 de *O. ovis* en la cavidad nasal durante el periodo de diapausa, se relaciona con la elevación de los niveles de IgM. A diferencia de lo observado por estos autores, en los animales reinfestados los niveles de IgM se redujeron durante el periodo de permanencia de las L-1 de *Hypoderma* spp. en los lugares de reposo.

#### **4.3.2.- DETERMINACIÓN DE LAS DISTINTAS POBLACIONES CELULARES SANGUÍNEAS DURANTE LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma* spp.**

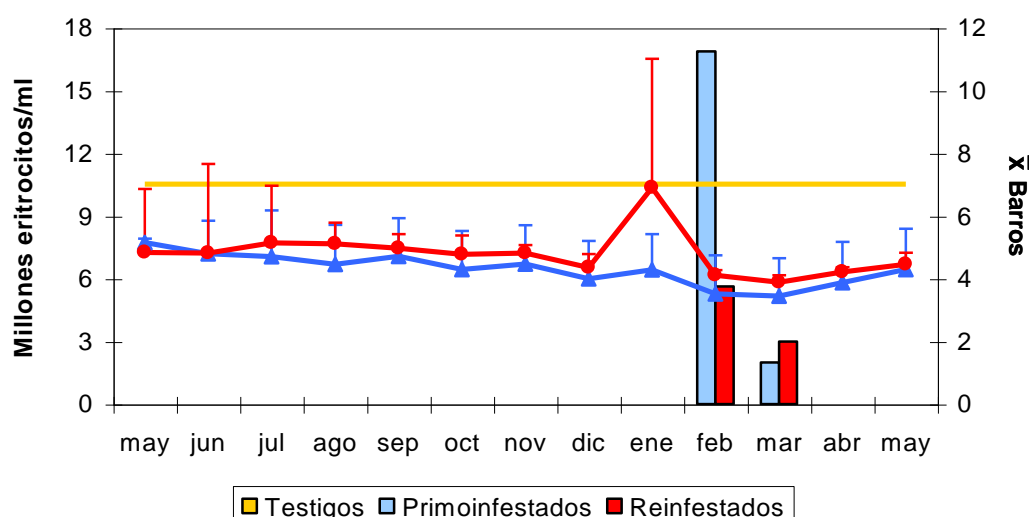
En este apartado nos propusimos estudiar, durante un ciclo completo del parásito, la evolución mensual de las principales poblaciones celulares sanguíneas en animales infestados de forma natural por *Hypoderma* spp., teniendo en cuenta el número de infestaciones previas.

Para interpretar más correctamente estos resultados hay que considerar que los diferentes estados fisiológicos (gestación, parto, lactación, etc.) por los que pasaron los animales durante el estudio, conjuntamente con la escasa especificidad de la respuesta celular.

##### **4.3.2.1.- Evolución del número de eritrocitos**

Aunque tras la infestación por *Hypoderma* spp., las variaciones más importantes se observan en las distintas poblaciones de la serie blanca; también hemos estudiado la serie roja y su relación con las distintas fases intraorgánicas de *Hypoderma*.

El número medio de eritrocitos por ml fue de  $10,5 \pm 2,03 \times 10^6$  para los terneros,  $6,5 \pm 0,8 \times 10^6$  en los animales primoinfestados y de  $6,8 \pm 1,3 \times 10^6$  en los reinfestados. Estos recuentos de eritrocitos, en los adultos primo y reinfestados, se mantuvieron en todo momento dentro del intervalo considerado fisiológico para el ganado vacuno, que según Rosenberger (1990) está comprendido entre  $5-8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  en los animales adultos. En el caso de los terneros, estos valores son fisiológicamente superiores a los de los adultos (Rosenberger, 1990). Como se puede apreciar en la figura 4.6, en enero, coincidiendo con la movilización de las larvas 1 hacia el dorso, se aprecia un aumento de los glóbulos rojos en los animales reinfestados, registrándose cifras de  $10,4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , valores que posteriormente descendieron de modo gradual y se mantuvieron constantes hasta el final del estudio.



**Figura 4.6.- Evolución del número de eritrocitos y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró aumentos significativos en el recuento de eritrocitos en los animales primoinfestados en las tomas de noviembre ( $F= 12,608$ ;  $P= 0,038$ ), abril ( $F= 10,923$ ;  $P= 0,046$ ) y mayo ( $F= 106,979$ ;  $P= 0,002$ ). En los animales reinfestados se detectaron dos descensos significativos en los meses de septiembre ( $F= 19,356$ ;  $P= 0,012$ ) y diciembre ( $F= 24,407$ ;  $P= 0,008$ ); y otros tantos aumentos significativos en los meses de octubre ( $F= 17,938$ ;  $P= 0,013$ ) y mayo ( $F= 40,661$ ;  $P= 0,003$ ).



Con la técnica posthoc de Bonferroni no se observaron diferencias entre el grupo de los animales primo y reinfestados.

De acuerdo con Macovei y col. (1986) y Baglioni y col. (1987), el ganado vacuno presenta en los últimos meses de gestación valores más elevados de hematocrito y hemoglobina. Estas cifras permanecen relativamente estables durante la lactación (Oltner y Berglund, 1983). Esta coincidencia impide asegurar con exactitud si la elevación de la serie roja en las vacas reinfestadas en enero responde a la presencia del parásito o al estado fisiológico de los animales en ese periodo.

En la bibliografía consultada hay pocas referencias relativas al efecto de la infestación por *Hypoderma* sobre la serie roja. Romaniuk (1973) observó, al principio de la fase migratoria de las larvas 1, una ligera disminución del número de eritrocitos; por el contrario en nuestro estudio no se registra un descenso acusado durante las fases de migración de *Hypoderma* spp.

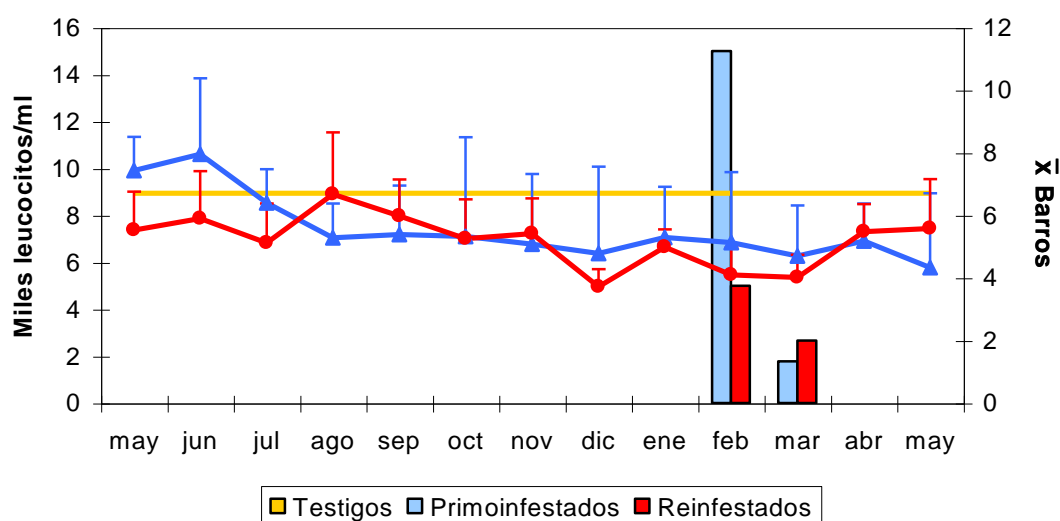
Panadero (1996) comprobó, en vacas frisonas infestadas naturalmente por *Hypoderma* spp., que las cifras de eritrocitos se mantenían dentro de los límites normales para esta especie bovina, aunque experimentaron un aumento significativo coincidiendo con la movilización de las larvas 1 hacia el dorso de los bovinos, que en este estudio no hemos detectado; además, al tener en cuenta la temporada de pastoreo, observó que los animales primoinfestados registraban cifras superiores a las de los reinfestados por primera y segunda vez.

#### 4.3.2.2.- Evolución del número total de leucocitos

Los leucocitos son los que más varían durante las infecciones parasitarias, incluida la hipodermosis; así pues, en este apartado estudiaremos la cinética de los linfocitos, monocitos y granulocitos (eosinófilos), considerando cada uno de los grupos de animales.

En la figura 4.7 se muestran las cifras de glóbulos blancos en el transcurso de la infestación por *Hypoderma* spp. Los recuentos medios de leucocitos circulantes a lo largo

del ciclo oscilaron entre los  $8,9 \pm 1,7 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  de los terneros y los  $7,0 \pm 1,1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  detectados en los animales reinfestados. En el caso de los primoinfestados, durante el estudio la media fue de  $7,4 \pm 1,2 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ . Estos valores se consideran normales de acuerdo con Rosenberger (1990), quien determinó que los recuentos fisiológicos de leucocitos en vacas adultas oscilaban entre los 5 y los  $10 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ .



**Figura 4.7.- Evolución del número de glóbulos blancos y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido no mostró diferencias significativas en la evolución del recuento de leucocitos a lo largo del tiempo en los animales primoinfestados. En el caso de los reinfestados se produjeron dos aumentos significativos en los muestreos del mes de agosto ( $F = 10,046$ ;  $P = 0,034$ ) y enero ( $F = 21,300$ ;  $P = 0,010$ ) y un descenso en el mes de julio ( $F = 35,164$ ;  $P = 0,004$ ).

Con la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre las vacas primo y reinfestadas.

En un estudio similar, Panadero (1996) comprobó que durante el ciclo de *Hypoderma* los valores de leucocitos se mantenían dentro de los considerados normales. Al igual que en nuestro estudio, esta autora verificó que, coincidiendo con las primeras fases de la migración larvaria, se producía una elevación de los leucocitos totales, contrariamente a lo

que sucedía durante la permanencia de las larvas en los lugares de reposo invernal. Esta respuesta también fue similar a la observada por Romaniuk (1973), quien constató que en los 2 primeros meses de migración larvaria se incrementaba de forma notable el número de leucocitos.

La movilización de las L-1 hacia el dorso se correspondió con un ligero aumento de las cifras de glóbulos blancos. De acuerdo con Colwell (1985) y Baron y Weintraub (1987) existe cierta correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular y la mortalidad larvaria en el hospedador, aunque en nuestro estudio los valores máximos alcanzados durante la migración de las larvas hacia el dorso fueron similares en ambos grupos.

Por el contrario, en los meses de permanencia de las larvas en los lugares de reposo se apreció un descenso del número de leucocitos totales. De acuerdo con Gingrich (1980), durante la fase de reposo en estos lugares el escaso estímulo antigénico por parte de las larvas hace que la respuesta celular sea poco marcada.

Al tener en cuenta el número de infestaciones previas, se observaron diferencias en los recuentos medios de glóbulos blancos durante un ciclo completo de *Hypoderma* spp. Así, en los animales infestados por primera vez, durante todo el ciclo se obtuvieron cifras medias de glóbulos blancos superiores a las de los reinfestados ( $7,3 \pm 1,2 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  y  $7 \pm 1,1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , en primo y reinfestados, respectivamente). Estos resultados coinciden con los de Lambert (1990) y Bezille (1993), quienes comprobaron que el número de leucocitos era superior en animales jóvenes infestados y descendía a media que aumentaba la edad.

#### 4.3.2.3.- Evolución de las distintas poblaciones leucocitarias en bovinos infestados por *Hypoderma* spp.

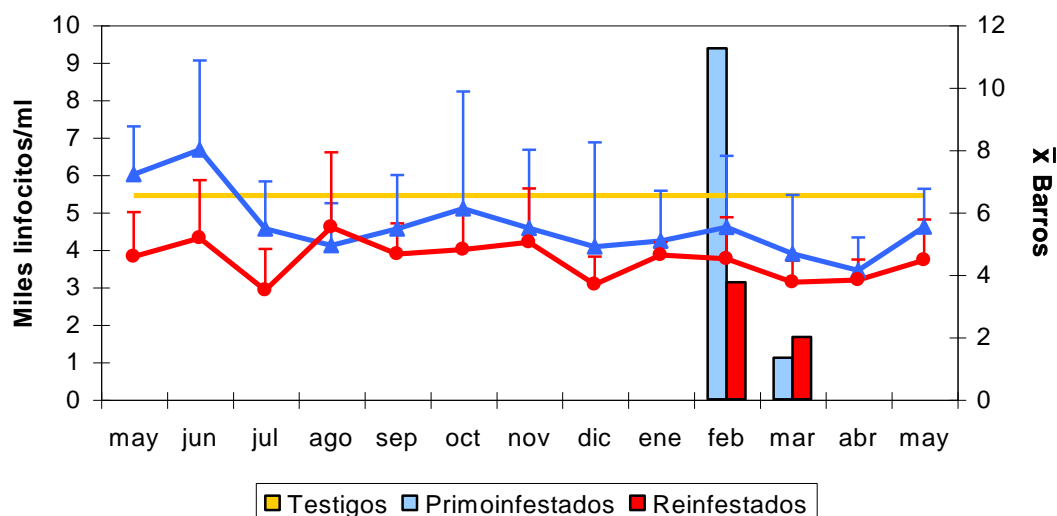
El leucograma representa el número de leucocitos circulantes y el recuento y la proporción respectiva de sus diferentes categorías. Cada una de las poblaciones leucocitarias desempeña funciones específicas en los mecanismos inmunitarios, y su mayor o menor demanda en los tejidos responde a estímulos específicos que serán los que determinen su presencia en la circulación sanguínea.

##### • *Linfocitos*

Los linfocitos se mantuvieron, en general, por debajo del límite máximo que Rosenberger (1990) consideró normales para las vacas adultas ( $2,5-5,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ).

En la figura 4.8 se observa que tanto en los animales primoinfestados como en los reinfestados se produce un aumento del recuento de linfocitos durante la infestación y consiguiente migración de las L-1 hacia los lugares de reposo (meses de mayo a septiembre). Durante el periodo de permanencia de las larvas en el esófago, los valores de linfocitos fueron más bajos que al inicio del estudio, aunque posteriormente aumentaron de nuevo ligeramente, coincidiendo con el reinicio de la migración larvaria hacia el dorso. Tras la desaparición de los barrotes en el dorso de los bovinos infestados, los recuentos de linfocitos descendieron nuevamente.

En los testigos el número medio de linfocitos por mililitro fue de  $5,4 \pm 8,90 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ .



**Figura 4.8.- Evolución del número de linfocitos y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

Al comienzo de la migración larvaria se registraron los recuentos máximos de linfocitos por mililitro. Así, en los animales primoinfestados el máximo se halló en junio ( $6,7 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ), al igual que en los reinfestados ( $4,3 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ). Durante el reinicio de la migración larvaria hacia el dorso, sólo se detectó un ligero aumento de los niveles de linfocitos, incremento que fue mucho menor al registrado durante la infestación y la migración de las larvas 1 hacia el esófago.

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un descenso significativo en los animales primoinfestados en la toma del mes de julio ( $F= 13,855$ ;  $P= 0,034$ ) y de marzo ( $F= 17,593$ ;  $P= 0,025$ ); asimismo, en este grupo se produjo un aumento significativo en el mes de mayo ( $F= 28,173$ ;  $P= 0,013$ ). En los reinfestados se hallaron diferencias con respecto a los muestreos previos en las tomas de julio ( $F= 34,372$ ;  $P= 0,004$ ) y agosto ( $F= 13,417$ ;  $P= 0,022$ ).

Mediante la técnica posthoc Bonferroni se observaron diferencias entre los animales primo y reinfestados, en la toma del mes de agosto ( $P= 0,011$ ).

Nuestros resultados coinciden con los de Baron y Weintraub (1987a), quienes observaron que la proliferación de linfocitos se incrementaba al inicio de la migración larvaria y de nuevo aumentaba durante la migración al dorso.

Al tener en cuenta la temporada de pastoreo en la que se encontraban los animales, hubo pocas diferencias en los recuentos linfocitarios, aunque en el caso de las vacas reinfestadas los valores de linfocitos siempre fueron menores que los obtenidos en las primoinfestadas.

Al igual que en el estudio de Panadero (1996), los recuentos linfocitarios se incrementaron al comienzo de la migración larvaria, así como durante el reinicio de la migración y aparición de las larvas en el dorso. Asimismo, las cifras de linfocitos fueron reducidas durante el periodo de reposo larvario.

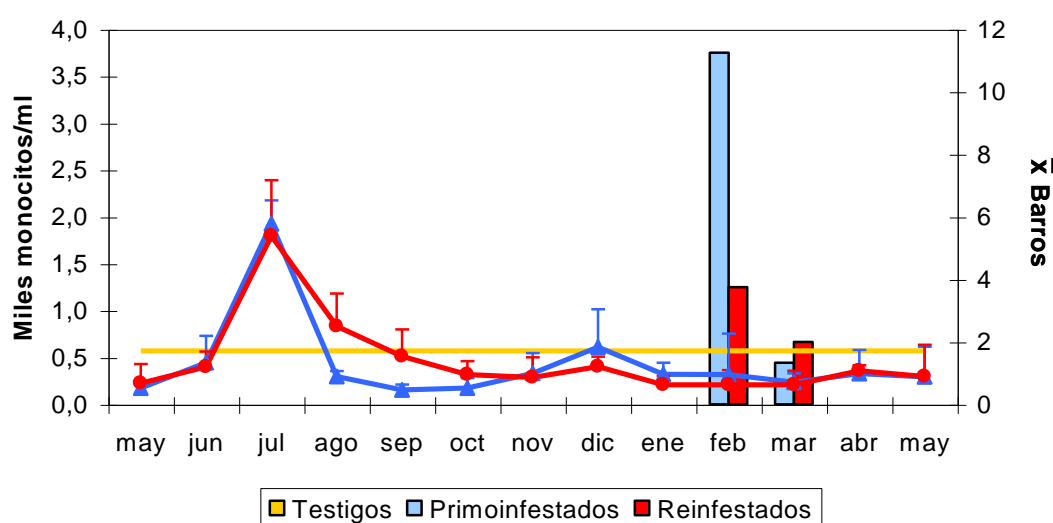
El incremento de las células linfocitarias durante la infestación también fue observado por Elhay y col. (1994) y Bowles y col. (1994) en ovejas infestadas por *Lucilia cuprina*. Al igual que en nuestro estudio, estos últimos autores observaron como este incremento se producía tanto en las ovejas primoinfestadas como reinfestadas.

### • Monocitos

Los monocitos desempeñan varias funciones entre las que se encuentran la de destruir agentes externos y procesar y presentar antígenos para inducir respuestas inmunitarias. Además, liberan mediadores solubles que amplifican la respuesta inmune, controlan la inflamación y contribuyen a la reparación del daño tisular.

En la figura 4.9 se recogen las variaciones mensuales de los recuentos de monocitos, y como se observa, los máximos niveles de monocitos se detectaron en los meses de julio y diciembre. Los valores medios de monocitos por mililitro de sangre a lo largo de todo el estudio fueron muy similares en los tres grupos de animales. Estos valores no sobrepasaron los fisiológicos que, según Duncan y Prasse (1986), oscilan entre el 2 y el 7% o entre los 25 y 850  $\text{ml}^{-1}$ , excepto en el mes de julio en el que los tres grupos de

animales superaron el máximo fisiológico. Al tener en cuenta el número de infestaciones previas de los animales, los recuentos de monocitos no variaron mucho. No obstante, en las vacas que habían sufrido infestaciones previas por *Hypoderma* spp., se observaron oscilaciones menos marcadas en los monocitos circulantes, coincidiendo con la migración larvaria hacia el esófago así como con el reinicio de la migración hacia el dorso.



**Figura 4.9.- Evolución del número de monocitos circulantes y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento en los animales primoinfestados durante el mes de julio ( $F = 93,300$ ;  $P = 0,002$ ), mientras que en este mismo grupo los descensos resultaron significativos en los meses de agosto ( $F = 161,121$ ;  $P = 0,001$ ) y septiembre ( $F = 117,434$ ;  $P = 0,002$ ). En el caso de los reinfestados, se hallaron aumentos significativos con respecto a los muestreos previos en las tomas de junio ( $F = 13,243$ ;  $P = 0,022$ ) y julio ( $F = 39,931$ ;  $P = 0,003$ ) y en este grupo los descensos resultaron significativos en agosto ( $F = 14,896$ ;  $P = 0,018$ ) y en enero ( $F = 13,960$ ;  $P = 0,020$ ).

Mediante la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias significativas en el recuento de monocitos circulantes entre los diferentes grupos de animales.

De nuevo encontramos muy pocas referencias sobre las variaciones de los monocitos en animales infestados con *Hypoderma* spp. Así, Romaniuk (1973) señala la

existencia de un elevado número de monocitos durante la fase de migración intraorgánica de las larvas de *Hypoderma* spp, circunstancia que no hemos apreciado en nuestro estudio.

### • Granulocitos

Las enfermedades parasitarias se caracterizan, en general, por el estímulo de los granulocitos implicados en diversos procesos de defensa del organismo hospedador. Los granulocitos, tienen un destino tisular y su presencia en la sangre es transitoria; de modo que su porcentaje en la fórmula leucocitaria reflejaría la cantidad de células que se dirigen hacia un determinado territorio tras la agresión parasitaria. Una vez en los tejidos, su función es la de fagocitar y destruir el material extraño, siendo su principal actividad biológica la eliminación extracelular de parásitos invasores merced a la liberación y actuación del contenido enzimático de sus gránulos.

En la figura 4.10 observamos como las cifras de granulocitos en las vacas primoinfestadas y reinfestadas por *Hypoderma* spp se elevaron coincidiendo con las distintas infestaciones sufridas por estos animales, con valores medios durante todo el estudio de  $2,5 \pm 0,7 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  en los primoinfestadas y de  $2,8 \pm 0,8 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  en los reinfestadas. En el caso de los terneros estas cifras medias fueron superiores ( $2,9 \pm 1,2 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ). Durante este estudio los niveles de granulocitos se mantuvieron, en general, ligeramente por debajo de los valores normales para esta especie bovina ( $3-9 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) según Rosenberger (1990).

La respuesta de los granulocitos se incrementó de nuevo en enero, coincidiendo con el reinicio de la migración de las larvas hacia el dorso del hospedador, contabilizándose como media  $2,5 \times 10^3$  y  $2,6 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , en los animales primo y reinfestados, respectivamente. Durante la permanencia de las larvas en el tejido subcutáneo, el recuento de granulocitos fue disminuyendo.

Teniendo en cuenta las infestaciones previas sufridas por los animales, los recuentos de granulocitos siguieron patrones bastante similares, aunque es destacable que los reinfestados, que previamente habían tenido contacto con el parásito, presentaron cifras de



granulocitos más altas durante la migración larvaria, si bien en el resto de periodos los recuentos fueron similares a los de los primoinfestados.

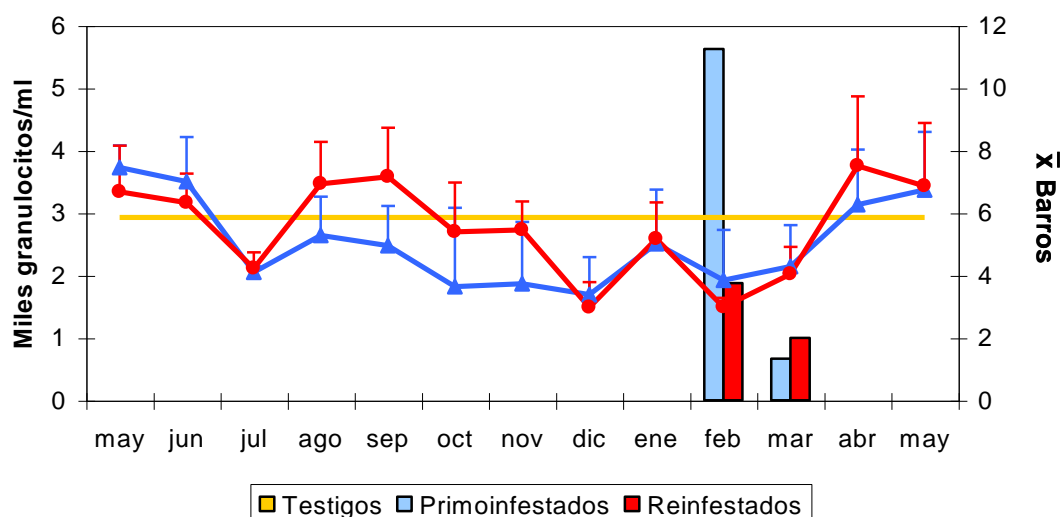


Figura 4.10.- Número de granulocitos y su relación con la presencia de nódulos larvarios

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un descenso en los primoinfestados en el mes de julio ( $F= 12,926$ ;  $P= 0,037$ ) y un aumento en abril ( $F= 31,114$ ;  $P= 0,011$ ). En la evolución del recuento de granulocitos, en los animales reinfestados tuvieron lugar descensos significativos durante julio ( $F= 29,875$ ;  $P= 0,005$ ), diciembre ( $F= 46,187$ ;  $P= 0,002$ ) y febrero ( $F= 13,452$ ;  $P= 0,021$ ), mientras que los aumentos resultaron significativos en los muestreos de agosto ( $F= 14,084$ ;  $P= 0,020$ ) y abril ( $F= 8,266$ ;  $P= 0,045$ ).

Mediante la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales infestados.

Entre las poblaciones de granulocitos más estudiadas en relación con la respuesta inmune frente a *Hypoderma* spp. están los eosinófilos. Así, en un estudio llevado a cabo en Galicia, Panadero (1996) comprobó que las cifras de eosinófilos en animales infestados por *Hypoderma* spp. se mantuvieron relativamente altas coincidiendo con las épocas de migración larvaria.

El hecho de que las vacas reinfestadas muestren una respuesta eosinófilica más intensa, confirma los resultados de Nelson y Weintraub (1972), Colwell (1989) y Nelson (1987), quienes encontraron una relación inversa entre la supervivencia larvaria en animales previamente infestados y los niveles de eosinofilia.

En nuestro estudio, la evolución de los granulocitos, en los cuales se incluyen lo eosinófilos, fue similar a la encontrada por Nelson y Weintraub (1972), Colwell (1985) y Nelson (1987), quienes después de la infestación por *Hypoderma* spp. detectaron un rápido incremento de los eosinófilos circulantes que se mantuvo durante la fase migratoria de las larvas, e incluso aumentó de nuevo con la aparición de las larvas en el dorso. De acuerdo con Doby y col. (1987b) la eosinofilia se mantiene mientras las larvas ejerzan su actividad secretora en los tejidos del hospedador, volviendo a la normalidad cuando cesa la misma.

También pusieron de manifiesto la importancia de la respuesta eosinófilica Durantón y col. (1997) en infestaciones por *O. ovis*, comprobando que la degranulación de los eosinófilos estaba directamente relacionada con la rápida mortalidad de las larvas de primer estadio.

### 4.3.3.- DETERMINACIÓN DE LOS DISTINTOS RECEPTORES DE SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS CIRCULANTES DURANTE LA INFESTACIÓN POR *Hypoderma*

En este apartado se estudió la población de linfocitos que expresaban en su superficie el receptor CD2 y dentro de esta población se diferenciaron los linfocitos colaboradores, los cuales expresan el receptor CD4 y los linfocitos citotóxicos que expresan el receptor CD8.

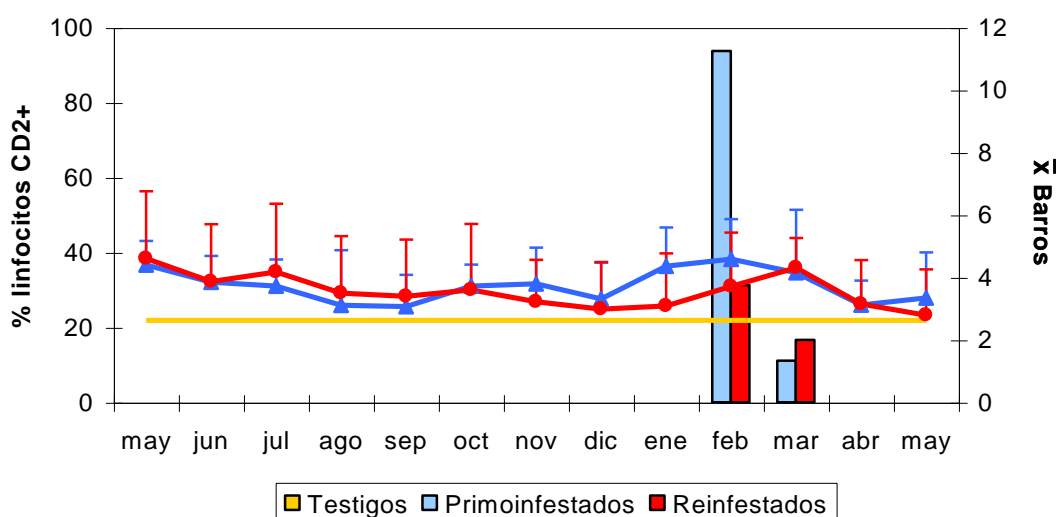
#### 4.3.3.1.- Linfocitos T (CD2<sup>+</sup>)

En la figura 4.11 observamos que los tres grupos de animales de este trabajo presentaron niveles muy similares de linfocitos T a lo largo del estudio.

En los animales primoinfestados el número de células T CD2<sup>+</sup> fue elevado al inicio del estudio (36,7% y 32,0% del total de linfocitos en los meses de mayo y junio, respectivamente), descendiendo posteriormente. Se incrementaron de nuevo tardíamente tras la infestación (31,0% del total de linfocitos en el mes de octubre). El máximo porcentaje de linfocitos T de este grupo se alcanzó en el mes de febrero (38,2% del total de linfocitos), periodo en el que aparecieron los primeros barros en el dorso de los animales. En los últimos mustreos, la proporción de linfocitos T descendió considerablemente hasta el 26,0% y 27,8% del total de linfocitos en los meses de abril y mayo, respectivamente.

En las vacas reinfestadas se observó un comportamiento caracterizado por un incremento durante el inicio de la infestación (34,8% del total de linfocitos en el mes de julio). Posteriormente, durante la permanencia de las larvas en el dorso, el porcentaje de linfocitos T aumentó nuevamente (35,9% del total de linfocitos en el mes de marzo). En este grupo, al igual que sucedía en el anterior, la proporción de linfocitos T descendió con la desaparición de los nódulos del dorso.

Por último, en los animales no infestados el porcentaje medio de linfocitos CD2<sup>+</sup> fue del 21,9%±5,17.



**Figura 4.11.- Linfocitos T CD2<sup>+</sup> circulantes y su relación con la presencia de nódulos larvares**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento significativo en los animales primoinfestados en el mes de enero ( $F= 24,580$ ;  $P= 0,016$ ), mientras que en los reinfestados se produjo un descenso en junio ( $F= 14,825$ ;  $P= 0,018$ ) y un aumento también significativo en febrero ( $F= 9,576$ ;  $P= 0,036$ ).

Con la técnica posthoc de Bonferroni no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales infestados.

Park y col. (1992) comprobaron que en vacas adultas, durante la lactación, el porcentaje de linfocitos T CD2<sup>+</sup> variaba entre los 45,2% y los 52,5%. Asimismo, Davis y col. (1988) describieron como normal, en las vacas adultas, un porcentaje de linfocitos T CD2<sup>+</sup> en sangre periférica que oscilaba entre el 46% y el 75%. Sin embargo, en nuestro estudio, los valores de estos linfocitos se mantuvieron siempre por debajo del mínimo mencionado por estos autores.

La importancia de los linfocitos T en la respuesta inmune también fue estudiada por Pérez y col. (1999) quienes comprobaron que la mayor sensibilidad de las cabras a las

reinfecciones por *Fasciola hepatica* se debía a una inhibición de la respuesta inmune local mediada por células, detectándose pocos linfocitos T CD3<sup>+</sup> en el infiltrado que rodeaba las vías migratorias durante la migración aguda.

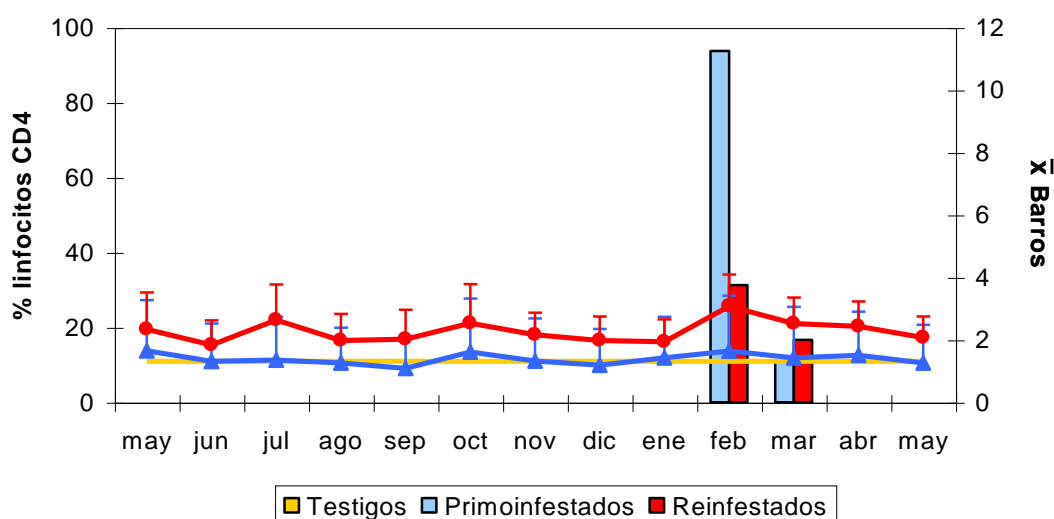
Teniendo en cuenta que el marcador CD3 también identifica los linfocitos T maduros, nuestros resultados son similares a los obtenidos por Pérez y col. (2002, 2005) en corderos infectados con *Fasciola hepatica*, quienes observaron un infiltrado inflamatorio hepático y ganglionar formado principalmente por linfocitos T CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.

#### 4.3.3.2.- Linfocitos T colaboradores (CD4<sup>+</sup>)

Dentro de los linfocitos T diferenciamos dos subpoblaciones, los CD4<sup>+</sup> y los CD8<sup>+</sup>. La maduración de los linfocitos T no tiene lugar en la médula ósea, sino en el timo. En este órgano todavía son inmaduros y no expresan los receptores para antígenos o marcadores de superficie. Estas células inmaduras migran desde la corteza hacia la médula y luego se ponen en contacto con las células epiteliales, macrófagos y células dendríticas. En su camino hacia la médula del timo, los timocitos comienzan a expresar los receptores de antígenos y marcadores de superficie presentes en los linfocitos T periféricos maduros. Así, la médula contiene principalmente linfocitos T maduros y sólo salen del timo las células T maduras, CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>, comprometidas hacia funciones colaboradoras o citotóxicas, que pasan hacia la circulación sanguínea y ganglios linfáticos periféricos.

Gráficamente (Figura 4.12) se observa que los animales primoinfectados muestran una evolución paralela a los reinfestados, si bien los primeros presentan niveles superiores. Los máximos porcentajes de linfocitos T colaboradores se obtuvieron en los meses de octubre y febrero. En los bovinos primoinfectados, en el mes de octubre los linfocitos T colaboradores representaban el 13,4% del total de linfocitos, mientras que en el mes de febrero éstos se habían elevado ligeramente (13,7%). Asimismo, en los animales reinfestados, en estos mismos meses, los valores fueron del 21,1% y 25,6%, en octubre y febrero, respectivamente.

En los testigos se aprecia un porcentaje medio de linfocitos T colaboradores de 10,91% sobre el total de los linfocitos.



**Figura 4.12.- Linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes y su relación con la presencia de nódulos larvares**

A pesar de estas diferencias aparentes, el análisis de varianza de muestras repetidas no indicó diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en el grupo de animales primoinfestados. La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un descenso significativo en los reinfestados, en el mes de agosto ( $F= 9,079$ ;  $P= 0,039$ ) y un aumento en los muestreos de octubre ( $F= 7,854$ ;  $P= 0,049$ ) y febrero ( $F= 7,708$ ;  $P= 0,050$ ).

Mediante la técnica de Bonferroni no se observaron diferencias entre el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los distintos grupos de animales.

Las células T CD4<sup>+</sup> se encuentran habitualmente implicadas en la respuesta inmune frente a las miasis, como la provocada por *Lucilia cuprina* (Bowles y col., 1992 y Broadmeadow, 1984).

En un estudio llevado a cabo por Park y col. (1992) en vacas de raza Frisona, observaron que el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las adultas variaba entre el 25,0% y 31,5% a lo largo de la lactación. Por otra parte, según Baldwin y col. (1986), el porcentaje

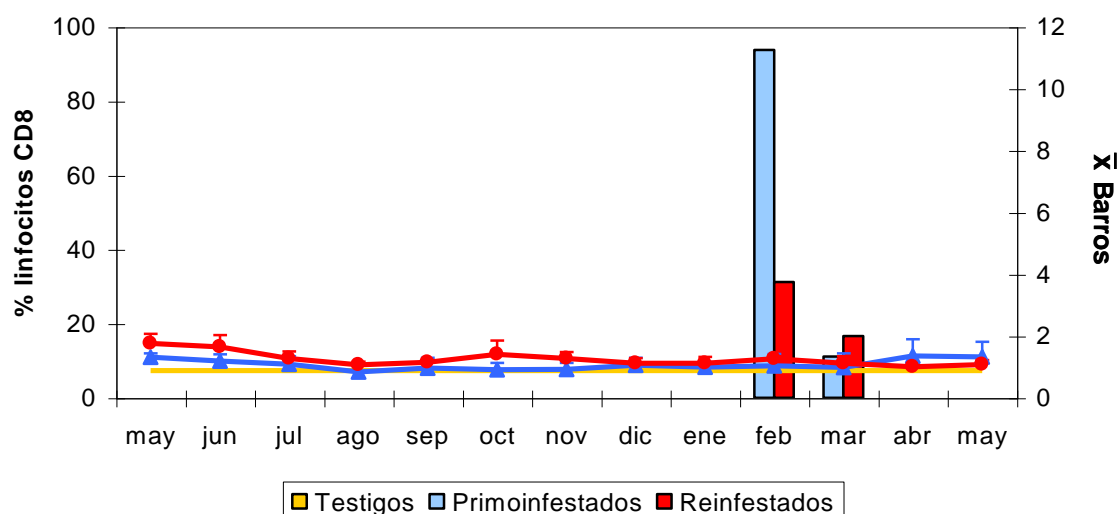
normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica de animales adultos oscila entre el 23% y el 35%. Asimismo, Sopp y Howard (2001) determinaron como fisiológico un porcentaje del 37,7% de linfocitos T entre los que presentan el receptor CD4 en su superficie. Al igual que en el caso de los linfocitos T CD2<sup>+</sup>, los porcentajes observados en nuestro estudio fueron inferiores a los determinados como fisiológicos por estos autores, lo cual nos lleva a pensar que la infestación por *Hypoderma* podría provocar un descenso en los niveles de este tipo de células.

Al igual que en nuestro estudio, Mbow y col. (1994) en ratones infestados experimentalmente con *Ixodes ricinus*, observaron mediante inmunohistoquímica, que en los reinfestados por segunda y tercera vez se observaron niveles significativamente más elevados de CD4<sup>+</sup>, respecto de los primoinfestados.

#### 4.3.3.3.- Linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> lisan las células que expresan antígenos extraños y de ahí que sean útiles en la eliminación de microorganismos que infectan y viven en el interior de distintos tipos de células. Los receptores para el antígeno en las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son incapaces de distinguir entre microorganismos extra e intracelulares. Por lo tanto, el reconocimiento específico se hace a través de las vías de presentación del antígeno asociadas a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad. De esta forma, los linfocitos T colaboradores reconocen péptidos unidos a moléculas CMH clase II y, por el contrario, las células CD8<sup>+</sup> reconocen péptidos unidos a moléculas CMH clase I. Por consiguiente, el hecho de que los antígenos se unan a moléculas de clase I o clase II del CMH en la presentación del antígeno asegura que las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> responderán frente a aquellos microorganismos a los que eliminarán más eficazmente.

En la figura 4.13 se observa una evolución muy similar de los linfocitos T citotóxicos en los tres grupos de animales, si bien se puede apreciar una mayor proporción de estos linfocitos al inicio del estudio.



**Figura 4.13.- Evolución del porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un descenso en los animales reinfestados en la toma del mes de agosto ( $F = 10,330$ ;  $P = 0,032$ ). En los primoinfestados el análisis de varianza de muestras repetidas no indicó diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> circulantes a lo largo del tiempo.

Mediante la técnica posthoc de Bonferroni no se observaron diferencias entre los diferentes grupos de animales.

Al igual que en nuestro estudio, Bowles y col. (1994), en la miasis provocada por *Lucilia cuprina*, comprobaron que durante la infección primaria la respuesta se caracterizaba por un número reducido de linfocitos citotóxicos. Asimismo, en las reinfestaciones de las ovejas, observaron que el incremento de los linfocitos citotóxicos era más pronunciado.

Van den Broek y col. (2005), mediante inmunohistoquímica, comprobaron que los linfocitos CD8<sup>+</sup> eran muy escasos en las infestaciones provocadas por ácaros, lo que coincide con lo observado en la sangre de los animales de este estudio. Asimismo, al analizar la evolución de estas células observaron que no mostraban ningún cambio significativo.



Según Park y col. (1992), los valores normales de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en sangre periférica de bovinos adultos de raza Frisona varían entre los 16,1% y los 21,2% a lo largo de la lactación. En otro estudio similar, Sopp y Howard (2001), en animales no infestados, determinaron que el porcentaje normal de linfocitos T CD4<sup>+</sup> era del 22,3% en frisonas adultas no infestadas. Al igual que en el casos anteriores, los porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> observados en nuestro estudio fueron inferiores, en animales adultos, a los detectados por estos autores.

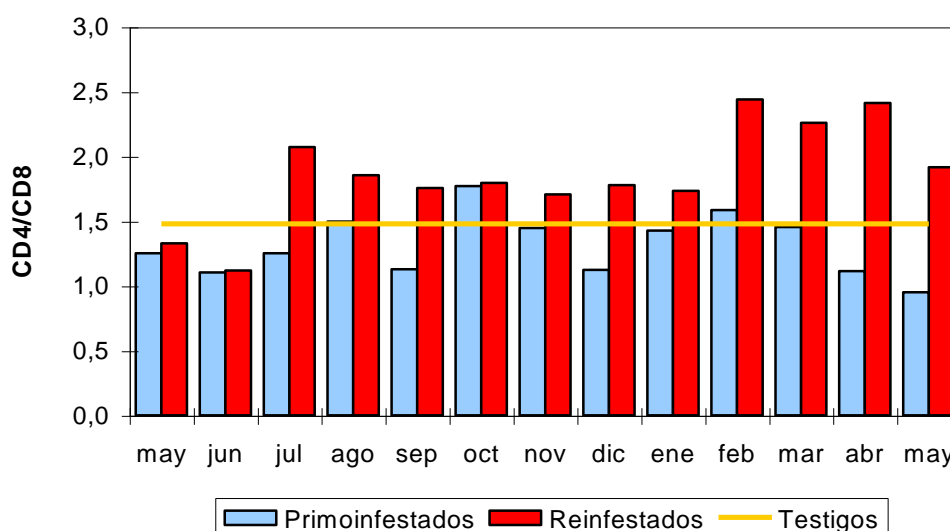
Wijngaard y col. (1992), en vacas adultas, describieron como normal porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en sangre periférica entre el 9% y 26%, lo que significa que los valores obtenidos en nuestro ensayo se encontrarían, en la mayoría de los muestreos, dentro de la normalidad.

Al igual que en nuestro estudio, en la infestación experimental por *Ixodes ricinus* en ratones, Mbow y col. (1994) observaron que en los infestados por primera vez, el número de células T CD8<sup>+</sup> era superior al de los testigo. En ese mismo estudio, comprobaron que en los animales reinfestados se observaban niveles significativamente más elevados de CD8<sup>+</sup> que en los primoinfestados.

#### 4.3.3.4.- Relación Linfocitos T CD4/CD8

Para conocer mejor la respuesta inmune celular durante la infestación por *Hypoderma lineatum*, resulta interesante estudiar la proporción de linfocitos citotóxicos y colaboradores. Para ello, calculamos el cociente CD4/CD8, y los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.14.

En los dos grupos de animales infestados se observa un claro predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos, y al estudiar la evolución a lo largo del tiempo, se detectaron diferencias apreciables entre ambos grupos, siendo característico de los reinfestados la alta participación de los linfocitos colaboradores respecto a los primoinfestados, sobre todo en las fases finales del ciclo biológico interno.



**Figura 4.14.- Evolución mensual del cociente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los animales primo y reinfestados**

A diferencia de lo que sucede en este estudio, en el que en los animales infestados el cociente linfocitos T CD4/CD8 siempre fue mayor a la unidad, Bowles y col. (1994) afirmaron que, en el desarrollo de otras miasis como la producida por *Lucilia cuprina* se producía un mayor aumento de las células T CD8<sup>+</sup> respecto de las CD4<sup>+</sup> a las 72 h.p.i., tanto en las ovejas primo como reinfestadas.

Coincidimos con lo señalado por Dacal (2009) quien comprobó en vacas primo y reinfestados por *Hypoderma lineatum*, un claro predominio de los linfocitos colaboradores sobre los citotóxicos durante la fase de penetración larvaria, aunque no existieron diferencias significativamente apreciables entre los distintos grupos de animales.

En otro tipo de parasitaciones como la causada por *Psoroptes ovis*, Van den Broek y col. (2005) comprobaron que, en la piel de las ovejas no infestadas, el cociente CD4/CD8 era de 4,3, incrementándose a 19 en 24 horas y a 37 a las 96 horas. Al progresar la infestación, los linfocitos CD4<sup>+</sup> seguían aumentando de tal forma que el cociente CD4/CD8 a los 49 días ya era de 70. Cocientes mayores de la unidad indican mayor predominio de los linfocitos colaboradores, lo cual lleva a pensar en la posibilidad de que la interacción de los antígenos del ácaro con las células CD4<sup>+</sup> suponga una contribución positiva para la

afluencia masiva de los eosinófilos tal como se observa en las lesiones cutáneas de ovejas reinfestadas (Van den Broek y col., 2000).

Colditz y col. (1996) comprobaron, mediante detección de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en muestras de piel, que el ratio CD4/CD8 en parasitaciones cutáneas por *Lucilia cuprina* supera la unidad, sugiriendo que la respuesta celular, y en concreto las poblaciones de linfocitos T, están implicadas en la menor importancia de esta enfermedad en las ovejas resistentes.

Boppana y col. (2004), en ovejas parasitadas por garrapatas del género *Ixodes*, detectaron que en todas las reinfestadas se producía un aumento del cociente CD4/CD8, respecto a las primoinfestadas, y además que este cociente siempre era superior a uno.

Park y col. (1992) comprobaron que en vacas de producción lechera la ratio CD4/CD8 normal es de 1,52 (1,18-1,81). En nuestro estudio se repite este predominio de los linfocitos T colaboradores frente a los citotóxicos y, por lo general, el valor de esta ratio se mantuvo dentro de los límites citados por estos autores.

Finalmente, Milnes y col. (2007) en un estudio en ganado vacuno infestado por los piojos, *Bovicola bovis* y *Solenoptes capillatus*, comprobaron nuevamente que el cociente CD4/CD8 era siempre superior a la unidad.

Nuestros resultados nos permiten concluir que en condiciones naturales, similares a las de este estudio, existe un predominio de los linfocitos colaboradores a lo largo del ciclo de *H. lineatum*. Este predominio es mayor en los animales reinfestados lo que indicaría que estas células estarían implicadas en el desarrollo de cierta resistencia frente al parásito.

#### **4.3.4.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE DIFERENTES CITOQUINAS EN ANIMALES INFESTADOS NATURALMENTE POR *Hypoderma* spp.**

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas en respuesta a un estímulo inmunitario, que influyen sobre las funciones de otras células como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, monocitos, fibroblastos, etc.

Tras el estímulo antigénico ejercido por la penetración de las L-1 de *Hypoderma lineatum* se secretan diferentes interleuquinas a nivel local que pasan a los plexos vasculares de la dermis superficial y que son distribuidas de forma sistémica a través de la circulación sanguínea, actuando como una señal inicial que indica daño en la piel y que activa el sistema inmune (Salmon y col., 1994).

En este estudio hemos incluido el análisis de varias citoquinas para las cuales existen anticuerpos de captura disponibles en el mercado y que son típicas de una respuesta de tipo Th1 (factor de necrosis tumoral, interferon-gamma e interleuquina 12) y de una respuesta Th2 (interleuquina 10 e interleuquina 4) para determinar la respuesta predominante en la infestación por *Hypoderma* spp.

##### **4.3.4.1.- Factor de necrosis tumoral alfa**

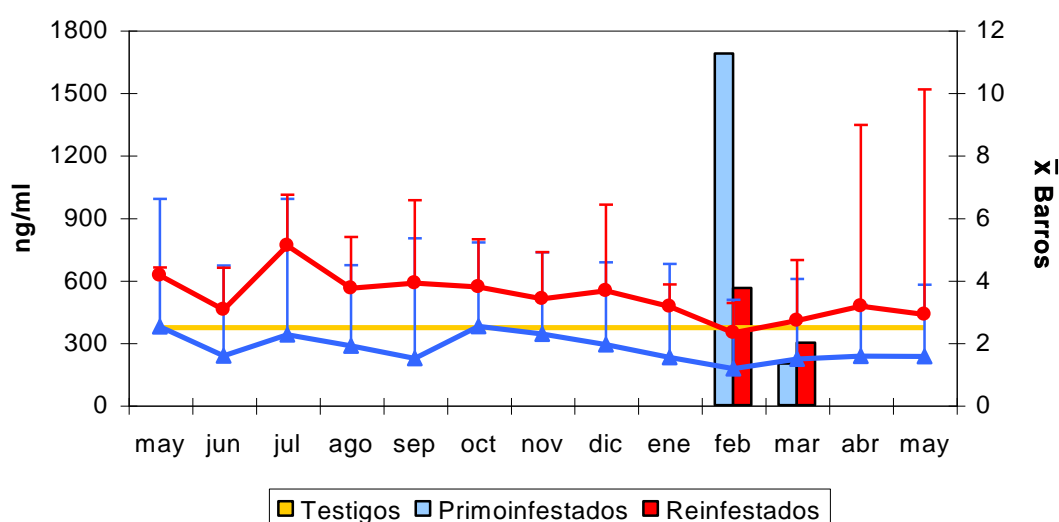
El TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria producida por numerosas células del sistema inmune, y con efecto importante en las respuestas inflamatorias locales ante los agentes extraños.

En la figura 4.15 se observa que la concentración de TNF- $\alpha$  en suero fue, por lo general bastante reducida y muy similar en los tres grupos.

En las vacas primoinfectadas la concentración de TNF- $\alpha$  en suero se mantuvo bastante constante durante el periodo de estudio, no encontrándose relación aparente entre los niveles de esta citoquina y las distintas fases del ciclo de *H. lineatum*.

En el grupo de los animales reinfestados se observó un comportamiento parecido al del grupo anterior, si bien en este caso los niveles fueron más elevados y además se detectó un incremento de las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$  en el mes de julio (765 ng ml<sup>-1</sup>) coincidiendo con la fase de migración de las L-1 hasta el esófago.

Finalmente, en los testigos la concentración media del TNF- $\alpha$  en suero fue de 0,25 $\pm$ 0,109 ng ml<sup>-1</sup>.



**Figura 4.15.- Concentración sérica del TNF- $\alpha$  y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento significativo en los animales primoinfectados en la toma del mes de octubre ( $F= 15,915$ ;  $P= 0,007$ ), mientras que en los reinfestados no se detectó ninguna diferencia con respecto a los muestreos previos.

A pesar de estas diferencias, el test de Bonferroni no detectó variaciones significativas en las concentraciones de esta citoquina entre los diferentes grupos de animales.

Al igual que en nuestro estudio, Dacal (2009) observó que en el suero de vacas primoinfectadas por *Hypoderma* spp. la concentración de TNF- $\alpha$  fue bastante reducida a lo largo del estudio y, por el contrario, en las animales reinfestadas por 2ª vez, se observaban niveles mucho más elevados que se incrementaban tras la penetración larvaria.

El TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la protección frente a aquellas parasitosis en las que se desarrolla una respuesta inmunitaria de tipo Th1. Así, Wei y col. (2006) indican su intervención muy activa en la toxoplasmosis, de forma que, por ejemplo, en los ratones vacunados, su concentración en suero o en cultivos celulares de bazo fue alta. En este caso se vio que el 88,9% de los ratones vacunados desarrollaban una respuesta eficiente a las 180 horas postinfestación y tenían una supervivencia significativamente superior. Además, Menard y col. (2007) observaron que en ratones infectados por *Toxoplasma* spp. el TNF- $\alpha$  expresado en la superficie de las células B aumentaba la expresión del IFN- $\gamma$  por las células T.

En el caso de la infección por *Leishmania* spp., Alves y col. (2008) demostraron que los perros infectados que no mostraban síntomas, presentaban niveles elevados de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , lo cual indicaba que estas dos citoquinas desempeñaban un papel importante en la protección contra la infección. De la misma forma, Zintl y col. (2005) demostraron que las infecciones por *Babesia bovis* parecían estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Schnittger y col. (2000) en ovejas y cabras infectadas por *Theileria annulata* comprobaron que las células afectadas por esta parasitación expresaban un mayor nivel de TNF- $\alpha$ , mientras que otras citoquinas como el IFN- $\gamma$  y la IL-4 estaban menos representadas.

No obstante, en trematodosis como la originada por *Fasciola hepatica*, Gironés y col. (2007) en ratas infectadas experimentalmente no comprobaron ninguna diferencia significativa en la secreción de TNF- $\alpha$ , si lo comparaban con las ratas control sin infectar.

#### 4.3.4.2.- Interferón gamma

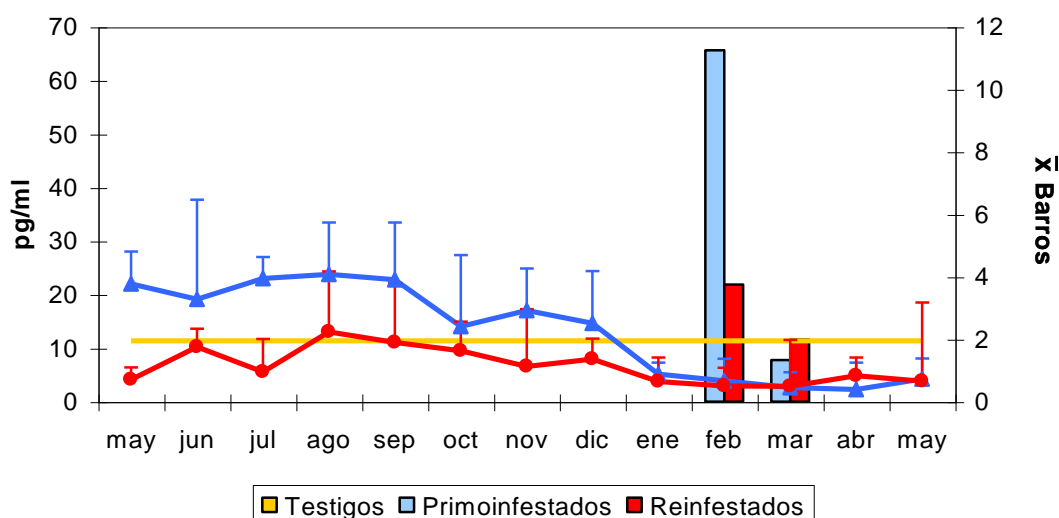
Esta citoquina forma parte del grupo de las respuestas Th1 y entre sus principales funciones están la activación de los fagocitos mononucleares, favorecer la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y, también es necesaria para la maduración de los CD8<sup>+</sup>, entre otras acciones. De esta forma, su efecto más directo consiste en favorecer las reacciones inflamatorias con abundancia de macrófagos, y al tiempo inhibir reacciones ricas en eosinófilos dependientes de IgE.

En la figura 4.16 se muestran los resultados de la concentración de esta citoquina en suero de los tres grupos de animales:

En los primoinfestados se observan niveles altos inicialmente, coincidiendo con la infestación de los animales (22,0 y 19,2 pg ml<sup>-1</sup> en mayo y junio, respectivamente). Estas concentraciones van descendiendo de forma progresiva hasta el final del estudio, en que se encuentran valores mínimos (4,0 y 2,6 pg ml<sup>-1</sup> en febrero y marzo, respectivamente) tras la aparición de los nódulos larvarios dorsales.

En los reinfestados se observó una curva similar, es decir, con un incremento inicial coincidiendo con la infestación de los animales y la migración de las larvas hacia el esófago (10,2 pg ml<sup>-1</sup> en junio y 13,0 pg ml<sup>-1</sup> en agosto), para posteriormente disminuir estos niveles de IFN- $\gamma$  y situarse en niveles mínimos tras la aparición de los barrotes (3,0 y 2,9 pg ml<sup>-1</sup> en febrero y marzo, respectivamente).

Finalmente, en los testigos las concentraciones medias para esta citoquina fueron de 11,3 $\pm$ 8,54 pg ml<sup>-1</sup>.



**Figura 4.16.- Concentración sérica de IFN-γ y su relación con la presencia de nódulos larvares**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró dos descensos significativos en el grupo de los animales primoinfestados en las tomas de octubre ( $F= 17,407$ ;  $P= 0,006$ ) y de enero ( $F= 7,667$ ;  $P= 0,032$ ); por el contrario en los reinfestados, no se hallaron diferencias con respecto a los muestreos previos.

Con la técnica posthoc de Bonferroni no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales infestados.

No obstante, a diferencia de lo que ocurría con el TNF- $\alpha$ , las vacas primoinfestadas mantuvieron niveles superiores de IFN- $\gamma$  a las reinfestadas, prácticamente a lo largo de todo el estudio.

A pesar de que, en general, en las infecciones por parásitos extracelulares como helmintos y artrópodos, la activación de las células T induce la expresión de un perfil de citoquinas Th2, siendo el Th1 (IFN- $\gamma$ ) típico de las infecciones intracelulares y bacterianas, son numerosos los estudios sobre artropodosis en los que se aprecia un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ .

En infestaciones experimentales con L-1 de *Hypoderma lineatum*, Dacal (2009) comprobó que la infestación, tanto en los animales primo como en los reinfestados, no



inducía un efecto significativo en las concentraciones de esta citoquina, puesto que permanecían constantes y sin grandes oscilaciones en su nivel sérico a lo largo del estudio.

En algunas protozoosis, la acción del IFN- $\gamma$  es vital para superar la infección. Así, por ejemplo en la leishmaniosis, la concentración de esta citoquina en el suero de los animales constituye una defensa muy importante; así en opinión de Fong y Mosmann (1990) y Muller y col. (1994) las células T citotóxicas producen concentraciones elevadas de IFN- $\gamma$  que juegan un papel decisivo en la activación de los macrófagos para la destrucción de *Leishmania*. Por otra parte, Swihart y col. (1995) en ratones genéticamente resistentes comprobaron que la ausencia de la expresión de los genes para IFN- $\gamma$  o su receptor aumentaba la sensibilidad a la infección. Más tarde, Alves y col. (2008) constataron que los perros asintomáticos presentaban el mayor nivel de IFN- $\gamma$ , lo cual indicaba que esta citoquina desempeña un papel importante en la protección contra la infección.

Del mismo modo, en la babesiosis el IFN- $\gamma$  es vital en la respuesta Th1 durante la infección por *Babesia bovis* (Goff y col., 2003). Además, Zintl y col. (2005) también observaron que las infecciones por *Babesia bovis* parecen estar controladas principalmente por una respuesta Th1 que conlleva la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Patterson y col. (1999) al inmunizar ratones con antígeno de *Plasmodium* spp. constataron niveles elevados de IFN- $\gamma$  en el suero. Además comprobaron que una respuesta prolongada del IFN- $\gamma$  se asociaba a un aumento de la supervivencia de los ratones infectados.

Abou-Bacar y col. (2003) y Rozenfield y col. (2005) apreciaron que la inmunidad protectora en ratones infectados con *T. gondii* estaba mediada principalmente por citoquinas secretadas en la respuesta Th1 y de forma especial por el IFN- $\gamma$ .

En otros grupos de parásitos como los helmintos, esta citoquina parece desempeñar un papel menos importante. Así, Claerebout y col. (2005), al estudiar la secreción de citoquinas en terneros infectados e inmunizados con fracciones de larvas 3 de *Ostertagia ostertagi*, observaron que después de la infección se producía una disminución en la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12). Por otra parte, Clery y col. (1996) comprobaron en un grupo de terneros con fasciolosis crónica natural y en otro lote de terneros reinfectados experimentalmente que no había variaciones de IFN- $\gamma$  y concluyeron que, puesto que la

infección se había establecido con éxito, se trataba de una respuesta linfocitaria no protectora de tipo Th2. Esta hipótesis ya había sido sugerida con anterioridad por Poitou y col. (1993); además, estos autores y Clery y col. (1996) señalaron que en el caso de fasciolosis crónicas, el hospedador limita su respuesta inmune con objeto de reducir las lesiones tisulares y limitar la extensión de la infección mediante una respuesta de tipo Th2.

Chevillard y col. (2003) en infecciones por *Schistosoma mansoni* comprobaron que los productos de excreción-secreción, se regulaban por la secreción de diferentes citoquinas, entre las cuales estaba el IFN- $\gamma$ . También vieron que niveles altos de IFN- $\gamma$  se relacionaban con una reducción notable del riesgo de fibrosis hepática. Por otra parte, la cinética del IFN- $\gamma$  y de la IL-10 mostraba que la respuesta protectora estaba regulada por las citoquinas tipo Th1 en fases tempranas de la infección. Estas observaciones demostraron que esta citoquina posee propiedades antifibrogénicas y profibrolíticas, inhibiendo la diferenciación de ciertas células y la producción de colágeno por los fibroblastos. Además también se comprobó que inhibía la activación de los lipocitos en el hígado dañado.

En la miasis provocada por *Lucilia cuprina*, Bowles y col. (1994) encontraron un aumento del nivel de IFN- $\gamma$  tras la infestación, siendo más elevado en la reinfestación.

#### 4.3.4.3.- Interleuquina 12

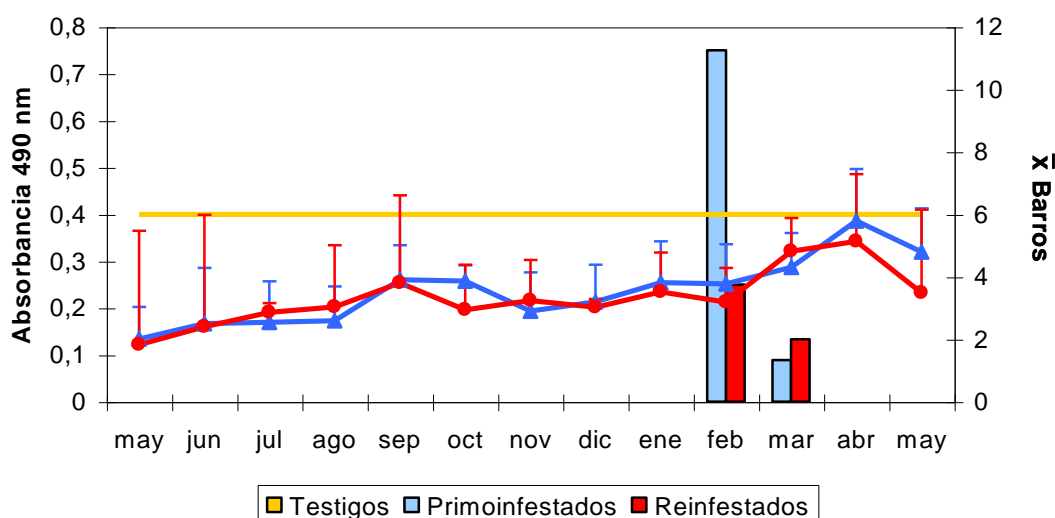
La interleuquina 12 (P40) es una citoquina derivada de las células B que se ha descrito como el factor estimulador de las células asesinas naturales. Esta proteína es un heterodímero con una actividad muy pleiotrópica que incluye la inducción de la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células asesinas naturales.

La evolución de esta citoquina a lo largo del ciclo de *Hypoderma* spp. se incluye en la figura 4.17. Hemos de señalar que, debido a la falta de IL-12 para realizar la curva patrón, no fue posible calcular su concentración, por lo que los resultados aparecen representados como valores de absorbancia a 490 nm.

En los animales primoinfectados, los valores de las absorbancias al inicio del estudio eran bajas. A partir de agosto aumentaron tras la finalización de la migración de las larvas hacia el esófago (0,260 y 0,257 DO en septiembre y octubre, respectivamente) y se mantuvieron elevados durante la permanencia de las larvas en los lugares de reposo. Posteriormente, las cifras de las DO descendieron hasta la aparición de los nódulos en el dorso, momento a partir del cual los valores de IL-12 volvieron a aumentar, alcanzando el máximo en este grupo en el mes de abril (absorbancia de 0,386 a 490 nm).

En los reinfestados se constató una evolución similar al grupo primoinfectado, alcanzando las máximas absorbancias tras la finalización de la migración de las larvas hacia el esófago y con la desaparición de los barrotes en el dorso.

Finalmente, en los testigos la media de las DO fue de  $0,4 \pm 0,192$ .



**Figura 4.17.- Niveles séricos de IL-12 y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento significativo en los animales primoinfestados en las tomas de septiembre ( $F= 8,129$ ;  $P= 0,029$ ) y abril ( $F= 7,556$ ;  $P= 0,033$ ), mientras que en la toma del mes de mayo tuvo lugar un descenso ( $F= 6,993$ ;  $P= 0,038$ ). En el grupo de las vacas reinfestadas se produjo un aumento en el muestreo de marzo ( $F= 28,496$ ;  $P= 0,006$ ).

Con la técnica posthoc de Bonferroni no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales infestados.

Dacal (2009) comprobó que en vacas infestadas experimentalmente con *H. lineatum* las absorbancias se mantenían constantes durante todo el estudio y que en las reinfestadas por 2ª vez se detectaban los valores de DO más bajos.

En ratones infestados por garrapatas, Ferreira y Silva (1998) observaron que la expresión de esta citoquina se inhibía de forma significativa en los ganglios linfáticos de los animales parasitados. D'Andrea y col. (1993), en células mononucleares de sangre periférica activados con *Staphylococcus aureus* o lipopolisacáridos, también observaron reducción de la IL-12 probablemente debida a la elevada producción de IL-10 y de IL-4. De esta forma la IL-10 junto con la IL-4 suprimiría la síntesis de la IL-12.

En el caso de *Ostertagia ostertagi*, Claerebout y col. (2005) afirmaron que después de la infección, se produce disminución en la respuesta Th-1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) y un incremento de la respuesta Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). En la triquinelosis, Helmby y col. (2003) concluyeron que la IL-12 regula la proliferación de los mastocitos, independientemente del IFN- $\gamma$ . Más recientemente, Wang y col. (2005) infectaron ratones con este parásito y comprobaron que los niveles de esta citoquina disminuía en los días 7, 21 y 35 post-infección.

En la leishmaniosis, Sypek y col. (1993) señalaron que las células asesinas naturales, activadas por la IL-12 son la fuente principal de la rápida secreción de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, esta citoquina no sólo juega un importante papel en el control de la resistencia inicial en las infecciones por *Leishmania major*, sino que también influye en el inicio de la diferenciación hacia Th1 en ratones resistentes (Scharton-Kersten y col., 1995).

En la toxoplasmosis, Wilson y col. (2008) comprobaron que la IL-12 desempeñaba un papel decisivo no sólo en la inducción de la expresión del IFN- $\gamma$  sino también en la diferenciación de células T CD8<sup>+</sup> en respuesta a este protozoo.

#### 4.3.4.4.- Interleuquina 10

Esta interleuquina actúa inhibiendo las respuestas del hospedador, sobre todo de aquellas en las que están implicados macrófagos, contribuyendo a la finalización de la respuesta inmune y a la consecución del estado de reposo del sistema inmunitario (Mosmann, 1994).

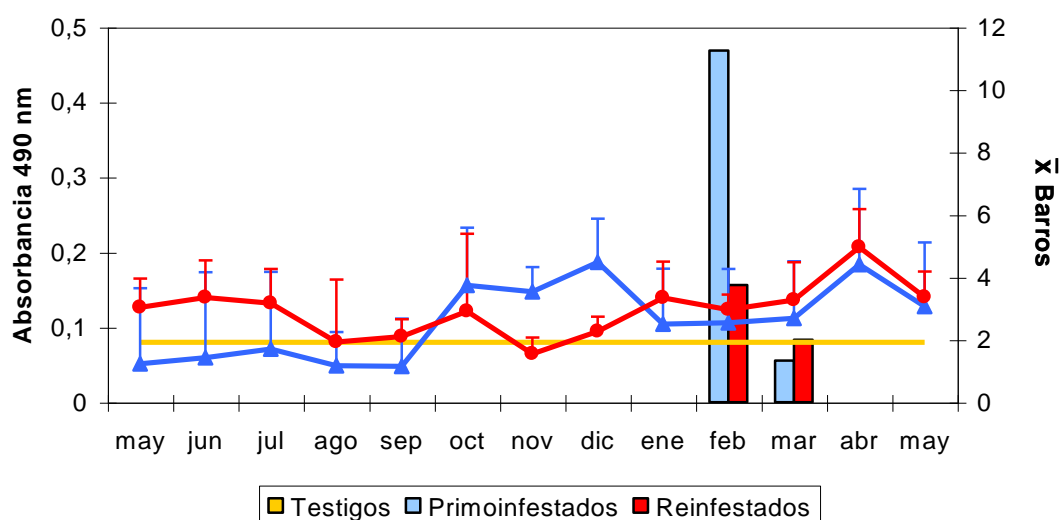
En la figura 4.18 aparecen representados los resultados de los niveles séricos obtenidos para la interleuquina 10. Al igual que ocurrió con la IL-12, la falta de IL-10 para realizar la curva patrón, no fue posible calcular su concentración, por lo que los resultados aparecen representados como valores de absorbancia a 490 nm.

En los primoinfestados, se produjo una elevación de las concentraciones de esta citoquina tras la llegada de las larvas al esófago, detectándose un máximo en el mes de

diciembre coincidiendo con el reinicio de la migración de las L-1 hacia el dorso. Posteriormente, los niveles de IL-10 se mantuvieron bajos hasta que se produjo una nueva infestación del ganado.

En los reinfestados los niveles de IL-10 alcanzaron valores elevados en los primeros meses del estudio coincidiendo con la reinfestación. Tras la finalización de la migración hacia el esófago, en octubre, se apreció un pico de absorbancia que posteriormente descendió durante la permanencia de las larvas en el esófago. A partir de ahí los niveles se redujeron, hasta el reinicio de la migración de las larvas hacia el dorso, periodo a partir del cual los valores de la DO se incrementaron y se mantuvieron altos coincidiendo con la estancia de las larvas en el dorso; a partir de abril y debido probablemente a una nueva reinfestación se observó un nuevo incremento en las cifras de absorbancia.

En los testigos la media de las absorbancias fue de  $0,08 \pm 0,057$ .



**Figura 4.18.- Seguimiento de los niveles séricos de IL-10 y su relación con la presencia de nódulos larvarios**

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un aumento en los animales primoinfestados en los muestreos de octubre ( $F= 20,017$ ;  $P= 0,004$ ) y de abril ( $F= 18,213$ ;  $P= 0,005$ ) y un descenso en mayo ( $F= 7,572$ ;  $P= 0,033$ ). En el grupo de los

reinfestados estas diferencias se produjeron en los muestreos correspondientes a enero ( $F = 21,748$ ;  $P = 0,010$ ), abril ( $F = 24,142$ ;  $P = 0,008$ ) y mayo ( $F = 11,817$ ;  $P = 0,026$ ).

Mediante la técnica posthoc Bonferroni no se observaron diferencias entre las concentraciones de los distintos grupos respecto a la concentración sérica de esta citoquina.

La IL-10 juega un importante papel en el control de ciertas enfermedades parasitarias como la esquistosomosis, toxocariosis, etc, disminuyendo las respuestas linfoproliferativas, modulando las respuestas granulomatosas e incluso induciendo la apoptosis de células T (Boros y Whitfield, 1998). Otra función de la IL-10 durante la hipodermosis es la inhibición de las reacciones granulomatosas, favoreciendo la migración y supervivencia de las larvas 1 durante su migración intraorgánica.

La elevación más temprana de los niveles de IL-10 en los primoinfestados podría haber favorecido la migración y supervivencia de las larvas en estos animales, lo que se traduciría en un mayor número de larvas en el dorso (figura 4.18) con respecto a los reinfestados; en estos últimos los niveles de IL-10 no aumentaron de forma significativa hasta el mes de enero, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria y el daño tisular producido por las L-1 durante la migración, fueron más intensos que en los primoinfestados.

Dacal (2009) en infestaciones experimentales de ganado vacuno con L-1 de *H. lineatum*, observó que en los primoinfestados los niveles de esta citoquina comenzaban a elevarse a las 6 h.p.i., mientras que en los reinfestados esta elevación era más tardía, con máximos a las 12 h.p.i. (reinfestados por 1ª vez) y a las 96 h.p.i. (reinfestados por 2ª vez).

En otras ectoparasitosis como las causadas por garrapatas, Kopecky y col. (1999) demostraron que la inyección de un antígeno de la saliva de *Ixodes ricinus* aumentaba la secreción de IL-10, lo cual podría explicar la mayoría de los efectos inmunomoduladores de las secreciones salivales de la garrapata. Del mismo modo, Ferreira y Silva (1998) al cultivar las células linfáticas de ratones parasitados con *Rhipicephalus* en presencia del mitógeno Con A, expresaban un perfil Th2, representado por el aumento de la secreción de IL-4 e IL-10.

Al analizar el papel de esta interleuquina en otras parasitosis, se comprueba que en el caso de algunos protozoos como *Leishmania* spp, Alves y col. (2008) observaron que la

expresión de la IL-10 fue significativamente superior en los ratones que manifestaban síntomas clínicos de la enfermedad. En el caso del protozoo hemático *Babesia bovis*, Goff y col. (2003) demostraron que al superar la enfermedad los animales ya no mostraban una reacción tipo Th1 y aparecían niveles altos de IL-10 que se mantenían durante periodos prolongados.

En *Trichinella spiralis*, Helmby y Grencis (2003) constataron que la expulsión de adultos del intestino se asociaba con una mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th2 que se manifestaba con una abundante secreción de IL-10.

En las infecciones por *Toxocara canis*, Torina y col. (2005) observaron que la concentración de IL-10 aumentaba durante la gestación en perras parasitadas.

En ratas infectadas experimentalmente con *Fasciola hepatica*, Gironés y col. (2007) afirmaron que esta citoquina ejerce asimismo una importante función, al observar un predominio de la respuesta Th2 en las 7, 10 y 20 s.p.i. con respecto a las citoquinas de tipo Th1. De esta forma, estos autores confirmaron que los niveles de la IL-10 eran más elevados en las ratas a las 7 s.p.i. mientras que a las 10 y 20 s.p.i. esta interleuquina disminuía. En otros trematodos como *Schistosoma* spp., Sher y Coffman (1992) afirmaron que la IL-10 también desempeñaba un papel fundamental al inicio de la infección y posteriormente se sustituía por una respuesta no protectora de tipo Th2.

Por otra parte, la producción de IL-10 y otras citoquinas de tipo Th2 contrarresta la acción de otras citoquinas de tipo Th1. Así, en las toxoplasmosis, Miller y col. (2006) comprobaron que los linfocitos CD4<sup>+</sup> producían niveles significativos de IL-4 e IL-10 que anulaban la respuesta inmunitaria del IFN- $\gamma$  con el fin de conseguir una respuesta adecuada.

En el caso de las trematodosis, Flynn y Mulcahy (2008) en vacas infectadas con *Fasciola hepatica*, comprobaron que la IL-10 regulaba la producción del IFN- $\gamma$  a lo largo de la infección, constatando que esta regulación conllevaba la supresión y facilitaba la supervivencia del parásito. Esta interleuquina desempeña un papel muy importante en el control del IFN- $\gamma$ ; de esta forma, Zhang y col. (2005), en ovejas parasitadas por *Fasciola*, sugirieron que el IFN- $\gamma$  y la IL-10 estaban implicados en la respuesta protectora, ya que el primero activa la producción de óxido nítrico por los macrófagos y la segunda disminuye la producción de IFN- $\gamma$ , con lo que también se reduce la cantidad de óxido nítrico. Esta



regulación es muy interesante ya que impide los daños que causaría una concentración excesiva de óxido nítrico.

#### 4.3.4.5.- Interleuquina 4

El papel principal de esta citoquina es promover la proliferación de los linfocitos B que han sido activados por un antígeno u otras moléculas de la superficie de las células. La respuesta de los linfocitos B a la IL-4 puede ser inhibida por el IFN- $\gamma$ . Por tanto, la IL-4 desempeña un papel importante en las reacciones inflamatorias mediadas por IgE y eosinófilos/mastocitos. Asimismo produce un aumento de la expresión de CMH de clase II y de presentación de antígeno.

La evolución en la producción de esta citoquina durante el ciclo de *Hypoderma* spp. en ganado vacuno aparece representada en la figura 4.19. Los tres grupos de animales del estudio, primoinfestados, reinfestados y testigos, mostraron concentraciones muy similares de IL-4 durante todo el periodo del estudio. Además, las variaciones en las concentraciones de esta citoquina tampoco se correlacionaron con las distintas fases del ciclo de *Hypoderma* spp.

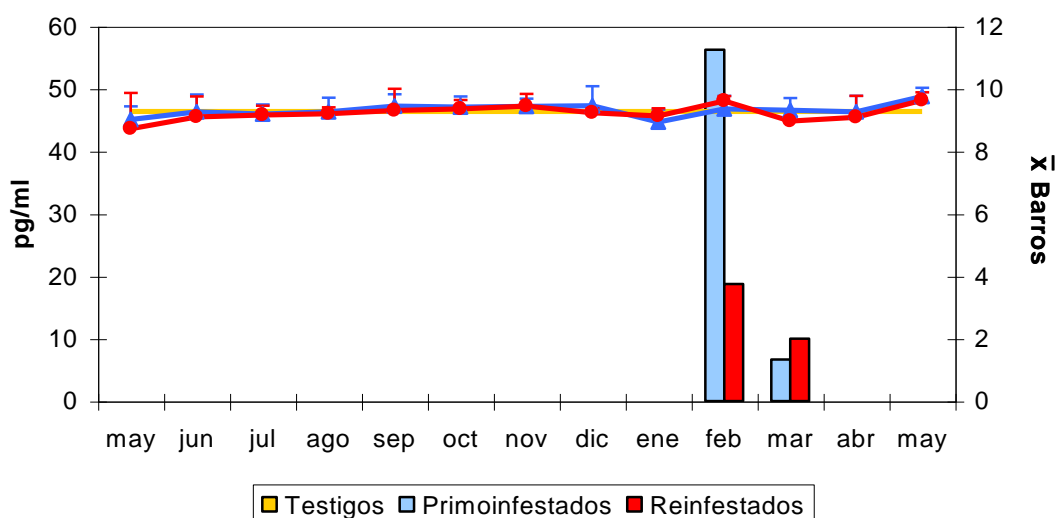


Figura 4.19.- Concentración sérica de IL-4 y su relación con la presencia de nódulos larvarios

La prueba ANOVA de muestras repetidas con contraste repetido mostró un descenso significativo en los animales primoinfestados en la toma del mes de enero ( $F= 7,462$ ;  $P= 0,034$ ) y aumentos significativos en los muestreos de febrero ( $F= 11,034$ ;  $P= 0,016$ ) y mayo ( $F= 36,965$ ;  $P= 0,001$ ). En el grupo de los reinfestados las diferencias se produjeron en los muestreos de los meses de febrero ( $F= 47,189$ ;  $P= 0,002$ ), marzo ( $F= 17,112$ ;  $P= 0,014$ ) y mayo ( $F= 16,808$ ;  $P= 0,015$ ).

Con la técnica posthoc de Bonferroni se observaron diferencias significativas en el mes de marzo en el grupo de los primoinfestados respecto al de los reinfestados ( $P= 0,043$ ).

En vacas infestadas experimentalmente por *H. lineatum*, Dacal (2009) también observó que la concentración de IL-4 se mantenía relativamente constante en tres grupos de animales infestados: primoinfestados y reinfestados por 1ª y 2ª vez.

Por otra parte, en la miasis provocada por *Lucilia sericata*, Elhay y col. (1994) destacan la ausencia de IL-4 en todos los animales parasitados.

En la miasis por *Lucilia cuprina*, Nash y col. (1996) no encontraron esta interleuquina en la dermis de ningún animal parasitado. Sin embargo, en corderos infestados por *Bovicola ovis* los niveles dérmicos de esta citoquina eran significativamente superiores a los no infestados (Shu y col., 2009).

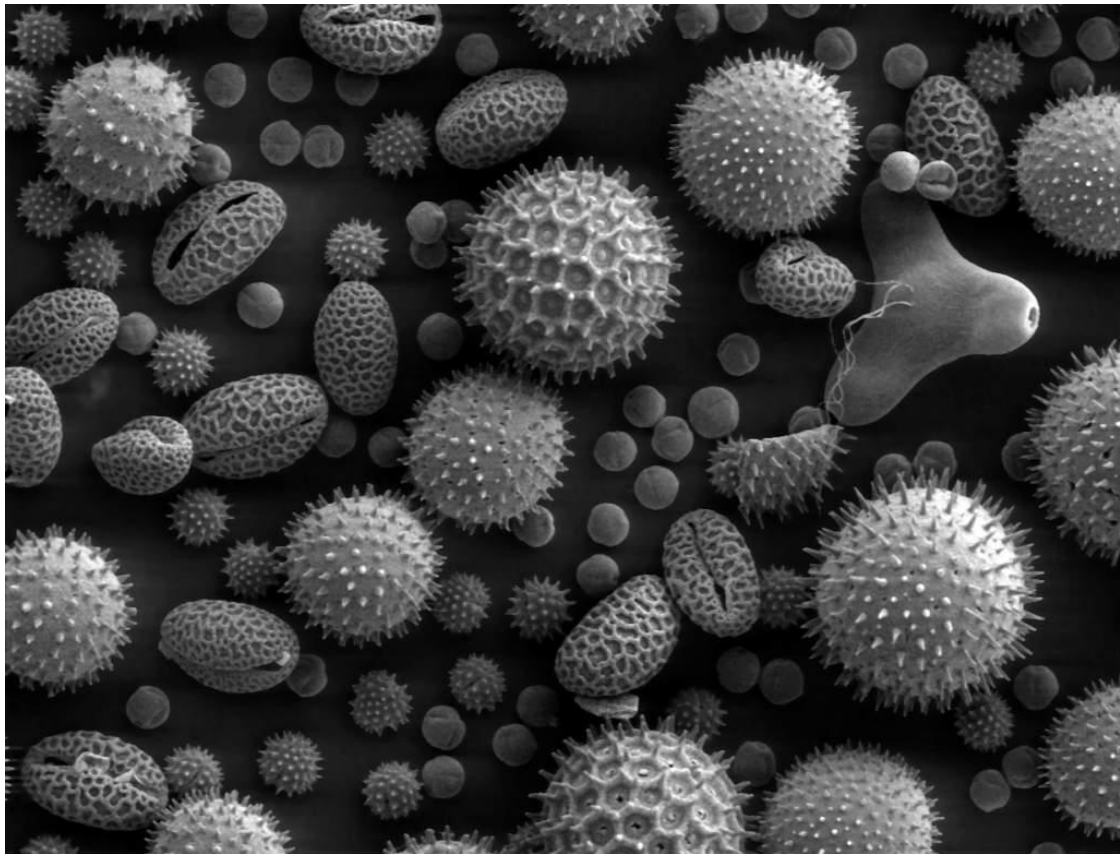
En la infestación por garrapatas, Ferreira y Silva (1998) en un cultivo de células linfáticas de ratones estimuladas con un mitógeno comprobaron el predominio de la respuesta Th2 representada por el aumento de la IL-4.

Gironés y col. (2007) en una infección experimental de ratas con *Fasciola hepatica*, comprobaron que los niveles de IL-4 a las 7 semanas después de la infección eran más altos en las infectadas que en las testigo. Posteriormente, a las 10 y 20 s.p.i. observaron una disminución de esta citoquina y en la semana 20 no encontraron diferencias en la secreción de las interleuquinas estudiadas. No obstante, observaron una correlación negativa y significativa entre el nivel de IL-4 y la eliminación de huevos a las 7 y 10 semanas post-infección.

Al igual que sucedió con la IL-10, la expulsión de los adultos de *Trichinella spiralis* del intestino se asocia con una mastocitosis pronunciada, mediada por una respuesta tipo Th 2 que se manifiesta con una secreción importante de citoquinas, en concreto IL-4, IL-10 y IL-13 (Helmby y col., 2003).

Una vez analizada la evolución de las distintas citoquinas en su conjunto podemos concluir que, en condiciones naturales, no se observa un patrón de producción típico de una respuesta tipo 1 o tipo 2; además la respuesta en los animales primo y reinfestados fue bastante similar para todas las citoquinas estudiadas, excepto para la IL-10 en la que, en los primoinfestados, se observó una elevación más temprana que en los reinfestados que se acompañó de un mayor número de larvas que completaron su desarrollo, lo que subrayaría el papel de esta citoquina como inhibidor de las respuestas del hospedador.

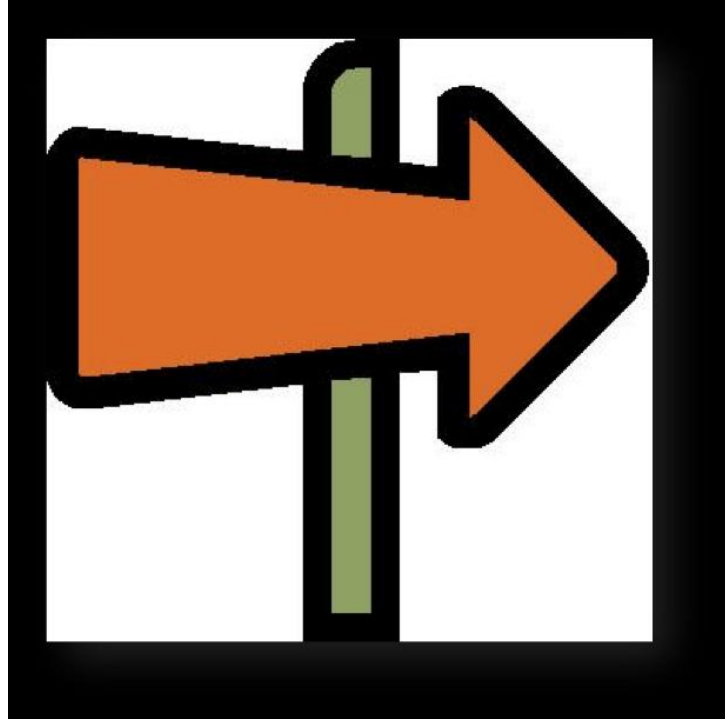




## **CAPÍTULO 3:**

### **EFECTO INMUNOMODULADOR DE LAS PRINCIPALES FRACCIONES ANTIGÉNICAS DE LARVAS-1 DE *Hypoderma lineatum***





## **5.1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**





Las larvas de primer estadio de *Hypoderma* spp. penetran a través de la piel intacta y migran a través del tejido conjuntivo con ayuda de las secreciones enzimáticas de sus glándulas salivales que se almacenan en su intestino medio (Boulard, 1969). La digestión tisular se produce extracorporeamente por la acción de las sustancias regurgitadas, de modo que los tejidos degradados y los exudados serosos son ingeridos por las larvas. Mediante el estudio de las secreciones de las L-1 ya hace algún tiempo que se han descrito y caracterizado tres serin-proteasas denominadas hipodermina A, B y C (Boulard y Garrone, 1978; Lecroisey y col., 1983). Existen evidencias de que las secreciones larvarias están implicadas en un proceso inmunomodulador que afecta tanto a la inflamación como a las respuestas inmunitarias específicas del hospedador y que contribuyen a la supervivencia del parásito durante su prolongada migración (entre 8 y 10 meses) a través del tejido conectivo del hospedador.

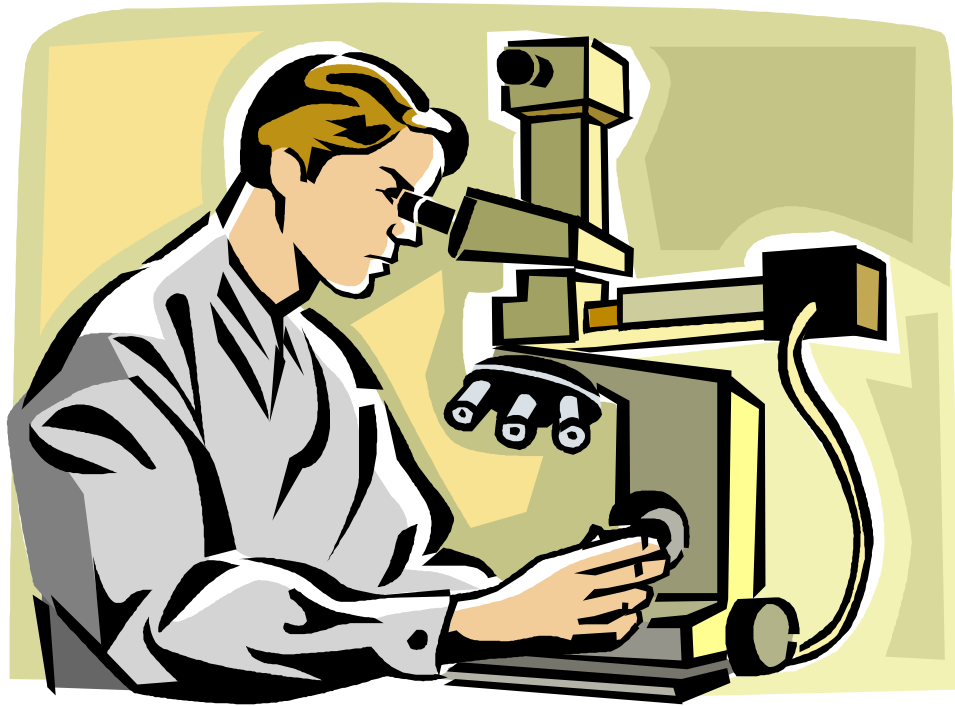
Durante la primera fase de la migración, las L-1 de *Hypoderma* spp. se encuentran continuamente expuestas a los mecanismos efectores del sistema inmune. Su supervivencia depende, en parte, de la evasión de la respuesta inmune o de la modulación del sistema inmune del hospedador.

La hipodermina A se considera como la más implicada en la evasión de la respuesta inmune, debido a que induce inhibición de la proliferación de linfocitos (Moiré y col, 1997). Al mismo tiempo la inhibición de la producción de la interleuquina 2 es uno de los mecanismos implicados en la inmunodepresión provocada por la HyA (Nicolas-Gaulard y col., 1995). Por lo tanto, es lógico pensar que diversas citoquinas podrían estar implicadas en la disminución de la respuesta específica a antígenos y estímulos policlonales causados por las secreciones larvarias.

El ganado vacuno desarrolla alguna resistencia de base inmunológica frente a la hipodermosis como resultado de la exposición natural (Gingrich, 1980). Varios estudios han puesto de manifiesto que la vacunación con proteínas larvarias estimula un aumento de la mortalidad de larvas (Pruett y Barret, 1985; Fisher y col., 1991). La hipodermina A ha demostrado un considerable potencial como candidato vacunal, al inducir un cierto grado de protección frente a esta parasitosis (Pruett y col., 1989). No obstante, se desconocen en gran parte los mecanismos y los compuestos antigénicos implicados en el desarrollo de protección frente a esta miasis.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se plantea un ensayo *in vitro* encaminado a profundizar en el conocimiento del efecto inmunomodulador de los distintos antígenos larvarios, y orientado hacia la consecución de los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.- Determinar el efecto modulador de un extracto crudo larvario obtenido a partir de L-1 de *Hypoderma lineatum*, así como de las fracciones purificadas hipodermina A, B y C, sobre la actividad del mitógeno concanavalina A en cultivos de células mononucleares obtenidas de sangre periférica.
- 2.- Establecer la influencia del extracto crudo larvario y de cada una de las hipoderminas purificadas sobre la producción de las citoquinas IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  en cultivos de células mononucleares.
- 3.- Comparar la respuesta linfoproliferativa y los patrones de secreción de citoquinas en cultivos de células mononucleares obtenidos de bovinos infestados por *Hypoderma* frente a los no infestados.



## **5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS**



### 5.2.1.- ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS

Para la realización de este ensayo se emplearon dos grupos de animales de raza Rubia Gallega procedentes del mismo rebaño empleado en el Capítulo 2:

1.- **Animales previamente sensibilizados por *Hypoderma*:** formado por 4 vacas reinfestadas naturalmente por *H. lineatum*. Estos animales habían tenido barros en el dorso el año anterior, de modo que, en el momento de ser incluidos en este estudio, se encontraban, como mínimo, ante su segunda infestación por *Hypoderma*.

En estos animales la infestación se confirmó mediante ELISA indirecto para la detección de anticuerpos y ELISA sándwich para la determinación de HyC, según los protocolos ya descritos en los apartados 3.2.5 y 3.2.6 del Capítulo 1. Las muestras de sangre se tomaron, aproximadamente, a los 6-8 meses post-infestación.

2.- **Animales no sensibilizados:** Ante la imposibilidad de encontrar ganado vacuno adulto sin contacto previo con larvas de *Hypoderma*, empleamos como animales no sensibilizados 4 terneros de 6-7 meses de edad, que nunca habían salido al pasto y, que no habían tenido oportunidad de infestarse.

En todos los animales las muestras sanguíneas se tomaron por punción de la vena caudal en tubos de vidrio heparinizados de 10 ml (Venoject®).

## 5.2.2.- ANTÍGENOS Y MITÓGENOS

### 5.2.2.1.- Obtención y purificación de las distintas fracciones antigénicas

La elaboración del antígeno de *Hypoderma* se llevó a cabo a partir de L-1 de *H. lineatum* recogidas de la submucosa esofágica de ganado vacuno sacrificado en un matadero local. Estas larvas permanecieron congeladas a -20°C hasta el momento de elaborar el antígeno.

Para obtener el antígeno bruto larvario o extracto total, las L-1 se homogeneizaron con un triturador de tejidos, Polytron (Kinemática AG), a razón de 10 larvas en 5 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, y se aplicaron varios ciclos de 5 minutos a 12.000 G. Para evitar elevaciones de temperatura, que pudieran activar los procesos enzimáticos o desnaturalizar las proteínas, entre cada ciclo, se mantuvo la mezcla en un baño con hielo. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó, durante 5 minutos a 15.550 G, para facilitar la separación de la fracción soluble, una parte del sobrenadante (ET) se distribuyó en alícuotas que se congelaron a -20°C hasta su empleo y la parte restante se destinó a la purificación de las distintas hipoderminas.

Las fracciones antigénicas, denominadas hipoderminas A, B y C se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico, empleando DEAE (diethylaminoetil) ligado a celulosa (DEAE-celulosa, Whatman) como intercambiador aniónico. El empaquetamiento y equilibrado de la columna se llevó a cabo con tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5.

Para la elución de las distintas fracciones antigénicas se utilizó ClNa a distintas concentraciones, de modo que la hipodermina A se eluyó con 50 ml de ClNa 0,1M, la B con 50 ml de ClNa 0,3 M y la C con 50 ml de ClNa 0,35 M (Panadero, 1996).

Cada fracción se dializó durante 12 horas en agua destilada para eliminar el exceso de sales, utilizando una membrana semipermeable de celulosa (Sigma) que retiene proteínas con un peso molecular igual o superior a 12 kD.

La pureza de las hipoderminas así obtenidas se verificó mediante electroforésis en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Posteriormente, se determinó la concentración proteica de cada fracción, mediante la técnica del BCA de Pierce (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL).

Finalmente, se liofilizaron los distintos antígenos y se ajustó su concentración a 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , se dividieron en alícuotas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.2.2.2.- Mitógenos**

El mitógeno elegido para la estimulación policlonal de las células mononucleares fue la concanavalina A (Con A, Biochrome AG) a una concentración de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para el ensayo de proliferación celular, y de 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para su empleo en la estimulación de la producción de citoquinas. La elección del mitógeno, así como la determinación de su concentración óptima y los tiempos de incubación se determinaron en ensayos preliminares (Dacal, 2006). En todos los ensayos se emplearon como testigos cultivos sin estimular a los que se añadió 100  $\mu\text{l}$  de PBS.

### 5.2.3.- AISLAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES

El aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante centrifugación diferencial en un gradiente de densidad con una solución comercial (BIOCOLL<sup>®</sup>, Biochrom AG), cuya densidad era de  $1,077 \text{ g ml}^{-1}$ . De esta forma, después de centrifugar, los eritrocitos y granulocitos, al tener una densidad mayor, se depositan en el fondo del tubo, mientras que los linfocitos que tienen menos densidad forman un halo blanquecino fácilmente visible por encima de la solución de aislamiento.

El protocolo seguido fue el siguiente (Figura 20):

- En tubos de vidrio de 10 ml colocamos 6 ml de Biocoll (densidad=  $1,077$ ) y después añadimos lentamente, con un pipeta Pasteur 4 ml de sangre heparinizada. La sangre se colocó suavemente sobre el Biocoll procurando no alterar la interfase, de modo que ésta quede en la parte superior. Estos tubos se centrifugaron a 700 G durante 30 minutos a temperatura ambiente.

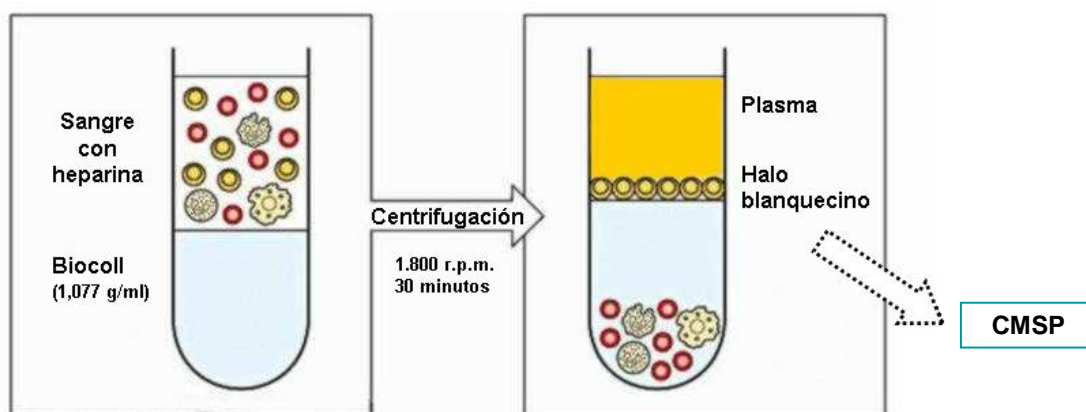


Imagen 20.- Protocolo de aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica

- Se extrajo la capa con los linfocitos que quedó situada entre el plasma y el Biocoll. Las células se lavaron 2 veces con 5 ml de la solución equilibrada de Hanks (HBSS, Biochrome AG) de pH 7,2, diluyéndola previamente diez veces, con el fin de mantener la osmolaridad de la membrana plasmática linfocitaria y para ello se centrifugó a 700 G durante 5 minutos.



- Se recogió el sedimento resultante después de centrifugar y se resuspendió en 3 ml de solución de Hanks.

Para cuantificar el número de linfocitos viables después del aislamiento se realizó un análisis de la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán, con los siguientes pasos: en primer lugar se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de células en un tubo de 3 ml y se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de PBS y 50  $\mu\text{l}$  de azul tripán. Posteriormente, se mezclaron y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de la mezcla y se depositaron en una cámara de Neubauer. Por último, se observó al microscopio a 400 aumentos, contando los linfocitos vivos, es decir los que no se tiñeron porque su membrana plasmática se conservó intacta.

A continuación se ajustó la concentración de linfocitos a  $5 \times 10^6$  linfocitos  $\text{ml}^{-1}$  para el ensayo de proliferación celular y a  $1 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  para el ensayo de producción de citoquinas

En los distintos ensayos *in vitro* se empleó un medio de cultivo completo que contenía RPMI-1640®, suero fetal bovino (descomplementado a 56°C en baño de agua durante 30 minutos) al 10%, 100 UI  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina, 20  $\mu\text{g}$   $\text{ml}^{-1}$  de estreptomycin y 1  $\mu\text{l}$   $\text{ml}^{-1}$  de anfotericina B.

#### 5.2.4.- TEST DE LINFOPROLIFERACIÓN

La proliferación de células T se analizó mediante un inmunoensayo colorimétrico basado en la medición de la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) incorporada durante la síntesis de ADN (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En este ensayo el desarrollo de color y, por lo tanto los valores de absorbancia están directamente correlacionados con la cantidad de ADN de nueva síntesis y por ende con el número de células proliferativas en los respectivos microcultivos.

**1.- Cultivos celulares:** las células mononucleares de sangre periférica aisladas de cada animal se cultivaron por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar,

Corning Ltd, Sunderland, Reino Unido), depositando en cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  ( $5 \times 10^5$  células) y estimulándolas con 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Con A y/o con uno de los respectivos antígenos (ET, HyA, HyB e HyC). En los pocillos testigo se colocaron el mismo número de células pero sin mitógeno. Los cultivos se mantuvieron en un incubador durante 48 horas a 37°C en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% y con 95% de humedad.

**2.- Incorporación de la BrdU al ADN celular:** a continuación se incubaron durante 24 horas con 110  $\mu\text{g}$ /pocillo de BrdU. Durante este periodo, la BrdU que es un análogo pirimidina se incorpora en lugar de la timidina en el ADN de nueva síntesis de las células linfoproliferativas.

**3.- Fijación y desnaturalización:** posteriormente las placas se centrifugaron a 300 G durante 10 minutos, eliminando todo el medio de cultivo por aspiración cuidadosa de cada pocillo y se dejaron desecar las células a 60°C durante 2 horas. A continuación se añadieron 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de etanol ácido al 70% (0,5M HCl) y se incubaron 30 minutos a 20°C. Finalmente, se lavaron 3 veces con PBS (pH 7,2) suplementado con BSA al 10%.

**4.- Incubación con un anticuerpo anti- BrdU marcado con peroxidasa:** se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo del conjugado a una dilución 1:100 y se incubaron durante 30 minutos a 20°C. Finalmente, se eliminó el conjugado mediante 3 lavados con 200  $\mu\text{l}$  de solución de lavado.

**5.- Adición de sustrato y revelado de la reacción:** se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de una solución de sustrato y se incubó a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Se detuvo la reacción con 25  $\mu\text{l}$ /pocillo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. Finalmente, se leyeron las DO a 450 nm.

El índice de estimulación para cada antígeno se calculó como la proporción entre la media de las absorbancias de los cultivos estimulados y la de los testigos:

$$\text{Índice de estimulación} = \frac{\text{DO cultivos estimulados Con A + antígeno}}{\text{DO cultivos estimulados Con A}}$$

### **5.2.5.- EFECTO DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES CELULARES**

Las CMSP se aislaron mediante el protocolo descrito anteriormente y se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Se cultivaron  $10^6$  células/pocillo en placas de 28 pocillos de cultivo celular (Costar) y se estimularon con  $15 \mu\text{g ml}^{-1}$  de Con A y/o con las diferentes fracciones antigénicas a una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . A las 48 horas de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  y en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% con 95% de humedad, se centrifugaron y el sobrenadante, libre de células, se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  para el estudio posterior de las citoquinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ .

Las concentraciones de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinaron mediante ELISAs sándwich específicos para cada una de ellas, siguiendo los protocolos descrito en el apartado 4.3.2 del Capítulo 2.

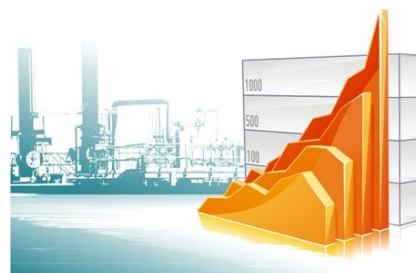
Las concentraciones de IL-4 e IFN- $\gamma$  ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) se calcularon según lo descrito en el apartado 4.2.3.1 del Capítulo 2. Tal y como ya se comentó, a falta de un patrón para la IL-10 bovina los resultados de esta citoquina se presentaron como valores de absorbancia a 490 nanómetros.

### **5.2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los resultados obtenidos en este apartado se analizaron con el programa SPSS 18.0.1 (SPSS Inc., 2009).

Para el análisis estadístico de los diferentes resultados obtenidos con los distintos antígenos se aplicó la prueba T-Student para muestras pareadas.

Para comparar la estimulación *in vitro* de las CMSP de los animales sensibilizados y no sensibilizados se empleó la prueba T de muestras independientes. Se consideraron significativas las diferencias cuando  $P \leq 0,05$ .



## **5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 5.3.1.- ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN CELULAR

La respuesta proliferativa debida a la Con A en ausencia de antígeno fue más intensa en las CMSP obtenidas de los terneros ( $1,5 \pm 0,30$ ) que en las de las vacas adultas previamente sensibilizadas ( $0,4 \pm 0,07$ ).

La respuesta linfoproliferativa de las CMSP de ganado vacuno inducida por el mitógeno Con A después de la estimulación con diferentes antígenos de *H. lineatum* se muestra en la figura 5.1.

Los índices de estimulación obtenidos con la hipodermina A fueron menores tanto en los animales sensibilizados como en los no sensibilizados. De modo que la HyA fue el antígeno que más inhibió la respuesta proliferativa, seguida por la HyB, la HyC y el ET.

El índice de estimulación de las CMSP de los animales no sensibilizados fue más bajo que el de los reinfestados con los diferentes antígenos estudiados.

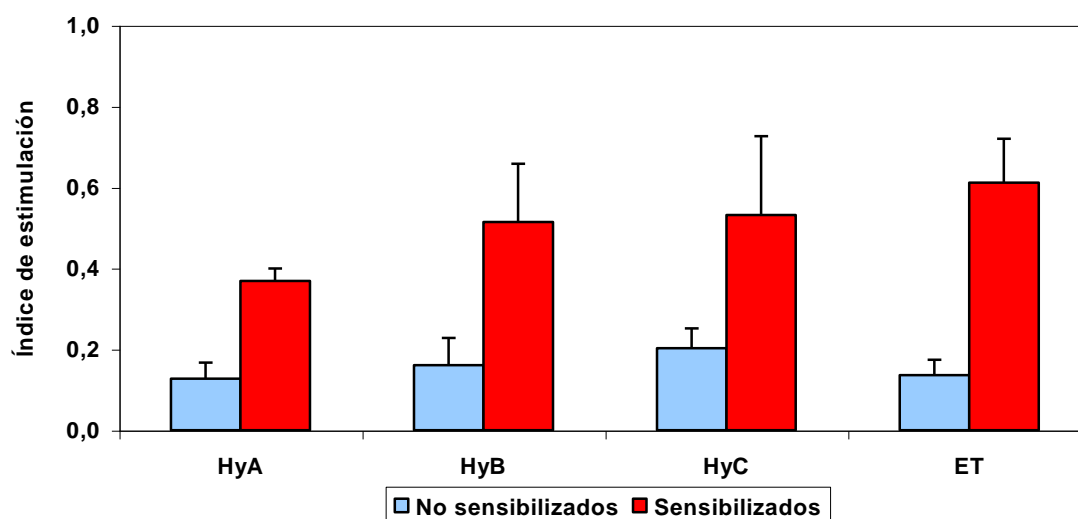


Figura 5.1.- Inducción de la proliferación de CMSP de animales sensibilizados y no sensibilizados en presencia de Con A y diferentes antígenos

Cuando se considera el índice de estimulación para los cultivos de los animales no infestados y previamente infestados en su conjunto, encontramos diferencias significativas entre la HyA y la HyB ( $P=0,043$ ), la HyC ( $P=0,033$ ) y el ET ( $P=0,035$ ).

Mediante la prueba T de muestras independientes comprobamos que el índice de estimulación de las CMSP de los animales no sensibilizados fue significativamente más bajo que el de las vacas reinfestadas con los diferentes antígenos estudiados ( $P<0,001$  para la HyA,  $P=0,004$  para la HyB,  $P=0,017$  para la HyC y  $P=0,002$  para el ET).

Asimismo, en los cultivos de los animales previamente infestados, el índice de estimulación obtenido con la HyA fue significativamente inferior ( $P=0,010$ ) al obtenido con el extracto total.

Según Baron y Weintraub (1987), la respuesta frente al mitógeno y ante la estimulación con distintos antígenos, especialmente en ganado vacuno previamente infestado, puede variar teniendo en cuenta las diferentes fases de la infestación. Estos autores detectaron que los bovinos expuestos a una tercera infestación consecutiva con *Hypoderma* tenían un número significativamente menor de barros en el dorso que los animales infestados por primera vez. Las vacas sensibilizadas presentaron una respuesta más intensa frente a los mitógenos Con A y PWM (pokeweed mitogen) y una fuerte respuesta específica frente al antígeno entre los 2 y los 7 meses postinfestación. Por el contrario, en los animales no sensibilizados la capacidad de respuesta frente a la estimulación antigénica no se evidenció hasta las fases finales del ciclo de vida de *Hypoderma* spp., lo que sugiere que el desarrollo de la resistencia adquirida es lento o bien está modulado por un proceso de inmunosupresión.

Muchos parásitos secretan proteasas que, a parte de facilitar la invasión de los tejidos y el metabolismo de proteínas del hospedador, favorecen también la evasión de la respuesta inmune del hospedador (McKerrow, 1999). Por lo tanto, las proteasas podrían emplearse para hipotéticas vacunaciones contra los parásitos o como nuevas terapias frente a trastornos inmunológicos.

En nuestro estudio, la HyA fue el compuesto más activo para suprimir la respuesta proliferativa de las células T, seguida por la HyB y la HyC. Los efectos inmunosupresores de la HyA sobre el sistema inmune del ganado vacuno han sido ampliamente estudiados



(Fisher y col., 1991; Chabaudie y Boulard, 1992; Nicolas-Gaulard y col., 1995; Khaznadj y col., 2003), de modo que la HyA se ha empleado recientemente en la inhibición del complemento humano para la prevención del rechazo hiperagudo en transplantes xenogénicos (Mckerrow, 1999). Se han descrito varios mecanismos involucrados en esta actividad inmunosupresora como, por ejemplo, la escisión del componente C3 del complemento (Boulard, 1989; Baron, 1990), la inhibición de la proliferación de los linfocitos inducida por mitógenos (Fisher y col., 1991; Chabaudie y Boulard, 1992), la sobreproducción de la PGE<sub>2</sub> y la inhibición de la producción de IL-2 (Nicolas-Gaulard y col., 1995) y la ruptura de las moléculas BoCD (Moiré y col., 1997).

La posibilidad de que la HyA pueda combinar un efecto inmunosupresor (aumento de la producción de IFN- $\gamma$  y supresión de la producción de la IL-10) y provocar la activación de la respuesta celular explicaría los buenos resultados obtenidos con esta hipodermina en varios ensayos vacunales (Pruett y Barret, 1985; Pruett y col, 1987, 1988; Chabaudie y col, 1991). No obstante, a pesar de que esta hipodermina es capaz de inducir una respuesta inmune, tanto humoral como celular en el ganado vacuno, el grado de protección alcanzado no es totalmente satisfactorio. Khaznadj y col. (2003) consideraron que el desarrollo de nuevas vacunas exigiría el bloqueo de la acción inmunomoduladora de la HyA mediante la obtención de una HyA recombinante, activa tanto desde un punto de vista enzimático como biológico y que no tuviera modificadas sus propiedades inmunogénicas.

Godon (1994) y Chabaudie (1987) demostraron la actividad antiinflamatoria de las HyA e HyB, mediante la inhibición, respectivamente, *in vitro* e *in vivo* de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos.

Barquet y col. (1992) demostraron la implicación de la hipodermina B en la expresión de moléculas activas para la migración y reclutamiento de los neutrófilos.

De acuerdo con Moiré y col. (1997) la actividad moduladora de la HyA e HyB podría deberse a una acción enzimática sobre las citoquinas u otros mediadores y/o por la degradación de los marcadores de superficie de los linfocitos implicados en la activación de la proliferación linfocitaria.

Al igual que en este estudio, la ausencia de capacidad inmunomoduladora de la HyC también fue detectada por Chabaudie y Boulard (1993), quienes demostraron en cultivos de

linfocitos de sangre periférica de ganado bovino que la HyC no tenía actividad proliferativa, citostática o tóxica por sí misma. Además, contrariamente a la HyA, la HyC no inhibía la acción del complemento ni la actividad quimiotáctica de los neutrófilos (Lecadre, 1985).

Al considerar el efecto combinado de las tres hipoderminas que integran las secreciones larvarias (ET), de igual forma que sucedió en infestaciones naturales, se observó que el ET produjo un marcado descenso de la respuesta proliferativa de las células de los animales no sensibilizados. Sin embargo, en las células de los animales previamente estimulados, el efecto conjunto del extracto crudo fue menor que el correspondiente a cada hipodermina por separado. Aunque es bien conocido que las secreciones larvarias se componen de estas tres proteínas principales, la presencia de otras moléculas menores en el extracto crudo de las L-1 no se puede descartar, aunque en nuestra opinión, sería bastante improbable que dichas moléculas pudieran provocar una respuesta tan marcada como la observada en este estudio.

### 5.3.2.- EFECTO DE LOS DISTINTOS ANTÍGENOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN SOBRENADANTES CELULARES

El efecto sobre la producción de las distintas citoquinas analizadas durante la estimulación *in vitro* con los diferentes antígenos fue bastante similar en los animales no infestados y en los previamente sensibilizados. No obstante, hay que señalar que las citoquinas se detectaron siempre en niveles más bajos en los cultivos procedentes de los terneros no infestados.

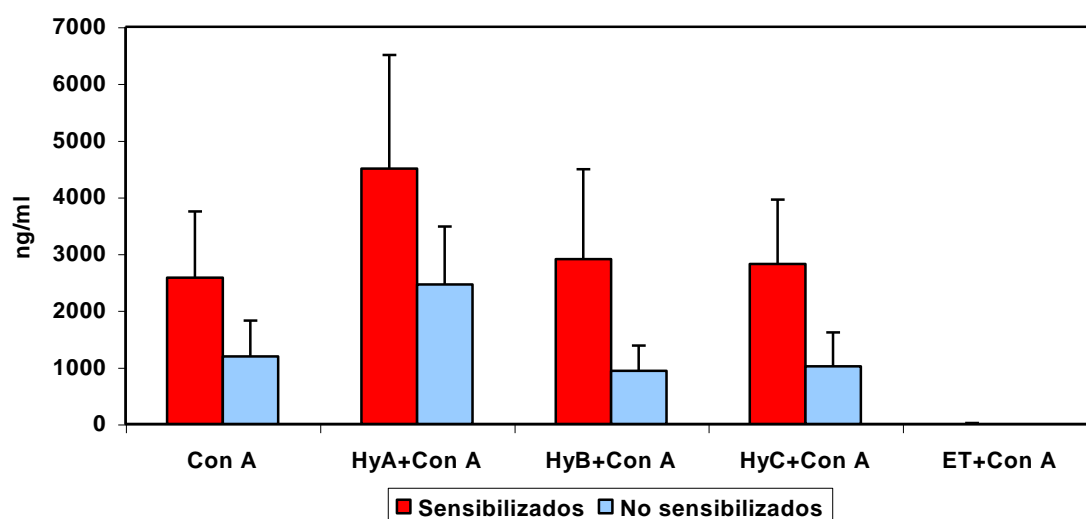
#### 5.3.2.1.- Interferón gamma

La producción de IFN- $\gamma$  por parte de las CMSP tras la estimulación con el mitógeno Con A y con Con A + antígeno se muestran en la figura 5.2.

La estimulación *in vitro* con HyA produjo un aumento de la concentración de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de los cultivos procedentes de los animales no infestados y de los previamente sensibilizados con respecto a los estimulados únicamente con el mitógeno.

Por el contrario, las CMSP incubadas con HyB y estimuladas por el mitógeno no presentaron grandes variaciones en la producción de IFN- $\gamma$ . Asimismo, la HyC no causó variaciones significativas en la producción de esta citoquina.

Curiosamente, el cultivo en presencia del extracto crudo larvario disminuyó notablemente la producción del IFN- $\gamma$  en los animales no infestados y en los previamente sensibilizados.



**Figura 5.2.- Niveles de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivos celulares de los animales sensibilizados y no sensibilizados en presencia de mitógeno y de diferentes antígenos**

Mediante la prueba T de muestras independientes se comprobó que las variaciones en la concentración del IFN- $\gamma$  eran significativas durante la estimulación con HyA, detectándose un aumento significativo en la concentración de esta citoquina en los sobrenadantes de los cultivos procedentes de los animales no infestados ( $P=0,019$ ) y de los previamente sensibilizados ( $P=0,039$ ). Por el contrario, no se hallaron diferencias significativas en la producción de IFN- $\gamma$  en los cultivos estimulados con HyB e HyC.

Por otra parte, la incubación en presencia del ET disminuyó significativamente la producción de IFN- $\gamma$  en los animales no infestados ( $P=0,027$ ) y en los previamente sensibilizados ( $P=0,012$ ).

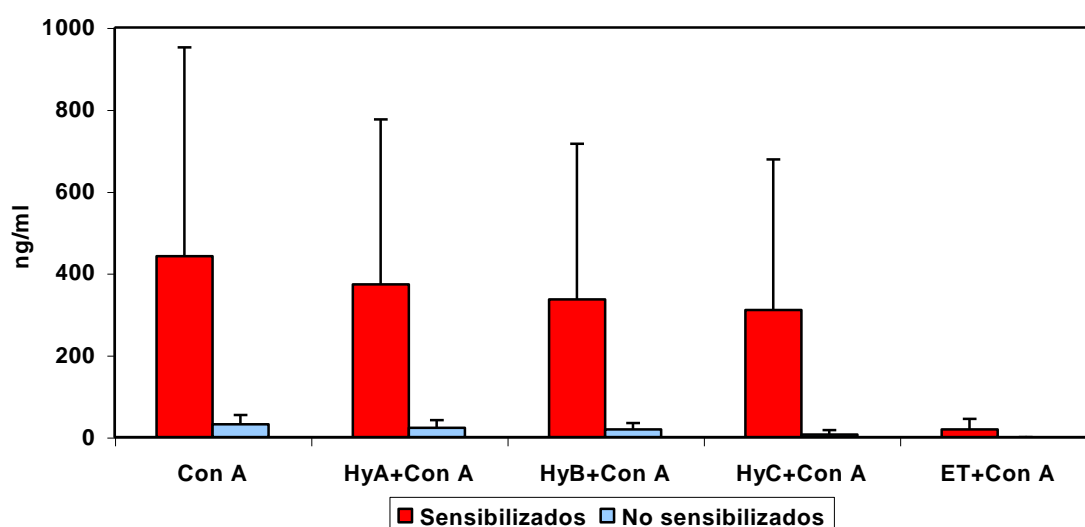
El aumento significativo de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las CMSP se correspondería con una respuesta de las citoquinas de tipo Th1.

### 5.3.2.2.- Interleuquina 4

Las concentraciones de IL-4 detectadas tras la estimulación de los cultivos con el mitógeno y los correspondientes antígenos se muestran en la figura 5.3.

La estimulación de los cultivos de CMSP con HyA disminuyó ligeramente la concentración de IL-4 en los animales sensibilizados y apenas la modificó en los no sensibilizados. De igual modo, la incubación con la HyB y la HyC produjo variaciones importantes en la producción de la IL-4 en ambos grupos de animales.

Por el contrario, el ET disminuyó la producción de IL-4 en los animales no sensibilizados y en los previamente sensibilizados.



**Figura 5.3.- Niveles de IL-4 en sobrenadantes de cultivos celulares de los animales sensibilizados y no sensibilizados en presencia de mitógeno y de diferentes antígenos**

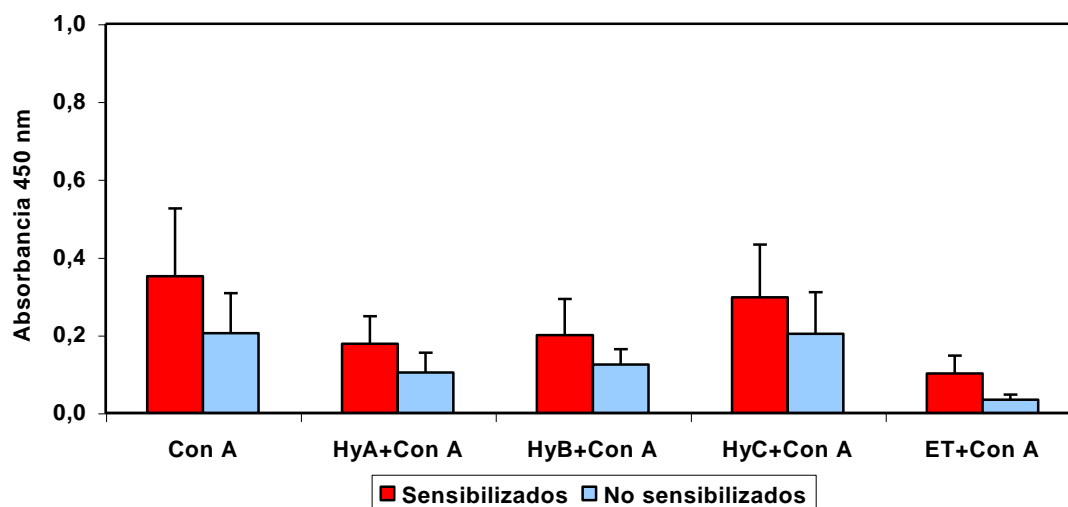
Mediante la prueba T de muestras independientes se demostró que el cultivo en presencia del extracto total disminuyó significativamente la producción de esta citoquina en los animales no infestados ( $P=0,035$ ). Por el contrario, no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones de IL-4 halladas en los cultivos incubados con HyA, HyB e HyC.

Es preciso indicar que, en este capítulo, las muestras sanguíneas se tomaron a los 6-8 meses después de la infestación, lo que coincidiría, según Panadero y col. (2007) con la migración de las L-1 hacia el dorso. Esta fase de la infestación por *Hypoderma* spp. se caracteriza por un marcado aumento de los niveles de anticuerpos (Colwell y Baron, 1990; Panadero y col., 1997) que podrían relacionarse con una alta producción de IL-4, que es un regulador clave de las respuestas humores, y que en este caso se ha observado en mayor concentración en los cultivos celulares de los animales infestados respecto de los no infestados.

#### 5.3.2.3.- Interleuquina 10

El cultivo de las células mononucleares con HyA produjo un descenso de los niveles de IL-10 en ambos grupos de animales, tanto no sensibilizados como previamente sensibilizados, en comparación con los cultivos estimulados únicamente con el mitógeno mediante Con A (Figura 5.4). La incubación con HyB también redujo la producción de IL-10 en ambos grupos de animales. Por el contrario, la HyC no provocó variaciones en la producción de esta interleuquina.

El cultivo en presencia del extracto crudo larvario disminuyó la producción de IL-10 en los dos grupos de animales.



**Figura 5.4.- Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivos celulares de los animales sensibilizados y no sensibilizados en presencia de mitógeno y de diferentes antígenos**

Al aplicar la prueba T de muestras independientes se vio que la estimulación con HyA producía un descenso significativo de los niveles de IL-10 en ambos grupos de animales, en los no infestados ( $P= 0,032$ ) y en los previamente sensibilizados ( $P= 0,046$ ). En cambio, no se hallaron diferencias significativas en los cultivos estimulados con HyB e HyC.

De la misma forma, el cultivo en presencia del ET disminuyó significativamente la producción de IL-10 en los animales no infestados ( $P= 0,034$ ) y en los previamente sensibilizados ( $P= 0,032$ ).

La reducción de la concentración de IL-10 observada en los sobrenadantes de los cultivos celulares puede deberse, en parte, al aumento paralelo de la producción de las citoquinas propias de la respuesta Th1 como sucede por ejemplo con el IFN- $\gamma$ .

Estos resultados obtenidos con la incubación de células mononucleares de sangre periférica con la HyA, sugieren una respuesta de las citoquinas de tipo Th1, como es la supresión de la producción de la IL-10. Igualmente hemos observado un aumento significativo de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de estas células. Este equilibrio daría lugar a una estimulación de la respuesta celular frente a las larvas, lo que supondría una contradicción con el efecto inmunosupresor observado, pero que permitiría la supervivencia de las L-1, especialmente en ganado vacuno no infestado previamente.

El efecto del extracto total, produjo un descenso sensible de la producción de las diferentes citoquinas que reflejaría lo que ocurre en las infestaciones naturales. Este estudio ha puesto de manifiesto que en las células de los animales previamente estimulados, el efecto del extracto crudo fue menos acentuado que el de cada hipodermis por separado, lo que nos llevaría a pensar que cada hipodermis produce un efecto individual que podría llegar a solaparse y/o limitar el efecto de las demás.





## **6.- CONCLUSIONES**



**De los resultados obtenidos en los diferentes apartados de este estudio, se extraen las siguientes conclusiones:**

1.- La variación de los niveles del antígeno hipodermina C en suero guarda estrecha relación con las distintas fases del ciclo intraorgánico de *Hypoderma*. Así, en las fases tempranas, por el reducido tamaño de las larvas, se produce un aumento moderado en los niveles de antígeno circulante, mientras que en fases posteriores, coincidiendo con la permanencia de las larvas en el esófago y su llegada al dorso se alcanzan los niveles máximos.

2.- La respuesta humoral durante el ciclo interno de *Hypoderma* sigue un modelo secuencial, de modo que las IgG2 se elevan con la llegada de las larvas al esófago en tanto que las IgG1 ven incrementados sus valores con la llegada de las larvas al dorso. Para las IgG totales hay niveles relativamente altos durante la fase esofágica, que se mantienen con la permanencia de las larvas en el dorso. Los niveles de IgM apenas varían a lo largo del ciclo de *Hypoderma*.

3.- En condiciones naturales no se evidenciaron diferencias entre la respuesta celular circulante en ganado vacuno primo y reinfestado. Asimismo, la respuesta celular (CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) en sangre periférica apenas se vio alterada durante la fase esofágica de *H. lineatum*, mientras que en los ganglios linfáticos, estas células se redujeron respecto de los animales no infestados.

4.- La evolución del número de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en sangre periférica fue muy similar en los animales primo y reinfestados, apreciándose en todos ellos un claro predominio de los linfocitos colaboradores que estarían implicados en las reacciones inflamatorias del hospedador y en el desarrollo de resistencia frente al parásito.

5.- La elevación más temprana de los niveles de IL-10 en los animales primoinfestados con respecto a los reinfestados se acompaña de un mayor número de

larvas que completan su desarrollo, lo que subrayaría el papel de esta citoquina como inhibidor de las respuestas del hospedador.

6.- Los distintos antígenos que componen las secreciones larvarias de *H. lineatum* producen un efecto inmunomodulador caracterizado por una marcada supresión de la respuesta proliferativa de los linfocitos T y por la producción de citoquinas IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ .

7.- La hipodermina A es la fracción antigénica con mayor actividad inmunosupresora, especialmente en ganado vacuno no infestado previamente, lo que contribuiría a explicar las mayores intensidades de parasitación halladas normalmente en la primera infestación.

8.- El efecto inmunomodulador del antígeno crudo larvario, integrado por las 3 hipoderminas, difiere en gran medida del ejercido por cada una de ellas por separado, lo que indicaría que algunos de los efectos de éstas podrían verse limitados.



## **7.- RESUMEN**



En la actualidad, es manifiesta la ausencia de relación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas y el grado de resistencia alcanzado por los animales infestados por *Hypoderma* spp, por lo que, se sospecha que la respuesta celular que ha sido menos investigada hasta el momento, juegue también un papel importante en la respuesta protectora frente a esta parasitosis.

Este estudio se ha proyectado con el fin de profundizar en la respuesta inmune celular y humoral durante las distintas fases del ciclo de *Hypoderma*. Para ello se ha dividido la parte experimental en 3 apartados. En el **primero** se estudió mediante citometría de flujo, hematología y ELISA, la respuesta celular y humoral que se produce durante la fase esofágica de *H. lineatum*, empleando para ello animales infestados y no infestados sacrificados en matadero. La determinación de los niveles circulantes del antígeno hipodermina C no mostró diferencias significativas entre los grupos de animales analizados. Con respecto a las IgG totales y la subclase IgG1, se evidenciaron niveles significativamente más altos en las vacas que presentaban L-1 de *H. lineatum* respecto del grupo de animales adultos no infestados y de los terneros. Los niveles de IgG2 fueron menores en los terneros respecto de los adultos con y sin L-1 en la submucosa. Mediante ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las cifras de absorbancia de IgM de los tres grupos de animales del estudio. El análisis con la citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias en sangre no evidenció diferencias entre los distintos grupos en cuanto al número de linfocitos T maduros (CD2<sup>+</sup>), colaboradores (CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), mientras que en los ganglios mediastínicos se observó que el porcentaje de linfocitos T maduros era significativamente menor en los adultos no infestados respecto del grupo de los terneros, y que el porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> era mayor en los terneros que en los dos grupos de adultos infestados. El predominio de los linfocitos CD4<sup>+</sup> frente a los CD8<sup>+</sup> durante la fase esofágica de *H. lineatum* indicaría que en este periodo, las respuestas de tipo inflamatorio y las de memoria dependen en gran medida de los linfocitos T colaboradores.

En el **segundo apartado**, aplicando la citometría de flujo y también la hematología y ELISA, se hizo un análisis de la respuesta celular y humoral en el curso de las distintas fases del ciclo biológico de *Hypoderma*, para lo que se emplearon vacas Rubia Gallega con infestación natural. Se distribuyeron en 3 grupos de 7 animales cada uno: testigos no infestados, primoinfestados y reinfestados. Los niveles del antígeno hipodermina C en suero mantuvieron relación directa con las distintas fases del ciclo intraorgánico de *Hypoderma*. Así, en las fases iniciales, el tamaño reducido de las larvas condiciona un aumento moderado de los

niveles de antígeno circulante, mientras que en fases posteriores, coincidiendo con la permanencia de las larvas en el esófago y su llegada al dorso, se alcanzaron los niveles máximos. La respuesta humoral durante el ciclo interno de *Hypoderma* siguió un modelo secuencial, de modo que las IgG2 aumentan con la llegada de las larvas al esófago, en tanto que las IgG1 incrementaron sus valores con la llegada de las larvas al dorso. Las IgG totales fueron relativamente altas durante la fase esofágica, y se mantuvieron así durante la permanencia de las larvas en el dorso. Los niveles de IgM apenas variaron a lo largo del ciclo de *Hypoderma*. Con respecto a las distintas poblaciones linfocitarias, se observó un aumento significativo de los CD2<sup>+</sup> en los animales primoinfestados en el mes de enero, mientras que en los reinfestados hubo un descenso significativo en junio y un aumento en febrero. El porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el grupo de animales primoinfestados no experimentaron variaciones significativas en el periodo de estudio y por el contrario, en los grupos reinfestados se apreció un descenso en agosto; en el caso de los CD4<sup>+</sup> también se observaron aumentos significativos en las tomas de octubre y febrero. Con la técnica posthoc Bonferroni no se hallaron diferencias entre los niveles de linfocitos CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los grupos infestados. En suma, se ha evidenciado el predominio de los linfocitos colaboradores durante el ciclo de *H. lineatum*, en particular en los animales reinfestados, lo que indicaría la intervención de estas células en el desarrollo de resistencia frente al parásito. En este capítulo se ha incluido el análisis, mediante ELISA sándwich, de varias citoquinas típicas de una respuesta de tipo Th1 (factor de necrosis tumoral, interferon-gamma e interleuquina 12) y Th2 (interleuquina 10 e interleuquina 4). Una vez analizada la evolución de las distintas citoquinas se deduce que, en condiciones naturales, no se puede establecer un patrón de producción típico de una respuesta tipo 1 o tipo 2. Además la respuesta en los animales primo y reinfestados fue bastante similar para las citoquinas estudiadas, excepto para la IL-10 donde se observó una elevación más temprana en el ganado vacuno primoinfestado que en el reinfestado acompañada de mayor número de larvas que completaron su ciclo, lo que subrayaría el papel particular de esta citoquina como inhibidor de las respuestas inmunitarias del hospedador.

El **capítulo 3** incluyó un ensayo *in vitro* encaminado a estudiar el efecto inmunomodulador de los distintos antígenos larvarios de *H. lineatum*. Para su realización se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de dos grupos de vacas (n=4) de Rubia Gallega del mismo rebaño empleado para el capítulo 2, es decir, sensibilizados y no sensibilizados frente a *Hypoderma* spp. El test de linfoproliferación mostró que la respuesta proliferativa debida al mitógeno concanavalina A en ausencia de antígeno, resultó más intensa en los cultivos de los terneros que en el caso de los individuos adultos previamente

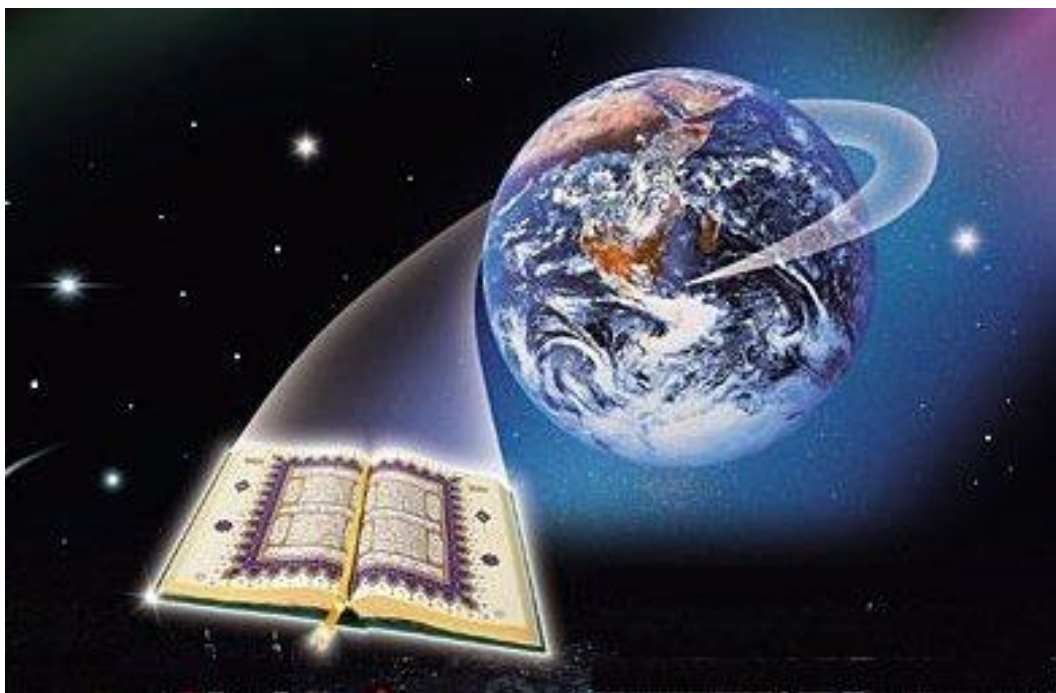


sensibilizados. Los índices de estimulación obtenidos con la hipodermina A fueron menores en todos los casos. Así pues, se evidenció la HyA como el antígeno que más inhibía la respuesta proliferativa, seguida por la HyB, la HyC y el ET.

Al analizar, mediante ELISA sándwich en sobrenadantes de cultivos de CMSP, el efecto de los distintos antígenos sobre la producción de las citoquinas, se vió que la estimulación *in vitro* con HyA aumentaba la concentración de IFN- $\gamma$  en los cultivos procedentes de los animales no infestados y de los previamente sensibilizados, respecto de los estimulados únicamente con el mitógeno. Por el contrario, en las CMSP incubadas con HyB y estimuladas por el mitógeno no hubo variaciones sustanciales de la producción de IFN- $\gamma$  y tampoco la HyC determinó variaciones significativas de la producción de esta citoquina. Curiosamente, el cultivo en presencia del extracto crudo larvario disminuyó notablemente la producción del IFN- $\gamma$  en los animales no infestados y en los previamente sensibilizados. La estimulación de los cultivos con HyA disminuyó ligeramente la concentración de IL-4 en los animales sensibilizados y apenas la modificó en los no sensibilizados. De igual modo, incubación con la HyB y la HyC no originó cambios importantes en la producción de la IL-4 en ambos grupos de animales. La estimulación con HyA produjo un descenso significativo de los niveles de IL-10 en los no infestados y también en los ya sensibilizados. En cambio, no se hallaron diferencias significativas en los cultivos estimulados con HyB e HyC. De la misma forma, el cultivo en presencia del ET disminuyó significativamente la producción de IL-10 en todos los animales estudiados.

El empleo del extracto total, fue seguido de un descenso considerable de la producción de las diferentes citoquinas lo que vendría a reflejar lo sucedido en las infestaciones naturales. Este estudio ha puesto de manifiesto que, sobre las células de los animales previamente estimulados, el efecto del extracto crudo fue menos acentuado que el ejercido por cada hipodermina por separado; esto nos llevaría a pensar que cada hipodermina produce efectos individuales que de alguna forma podrían llegar a solaparse e incluso limitar sus efectos.





## **8.- BIBLIOGRAFÍA**



- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, S. J. (2002). *Inmunología celular y molecular* (cuarta edición). Ed Mc Graw-Hill, Interamericana. 577 pp.
- ABOU-BACAR, A.; PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. (2004). Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infection and Immunity*, **72** (3): 1397-1401.
- ABUL-HAK, J. (1973). Seasonal occurrence of *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae) warble flies on cattle in Baghdad area, Iraq. *Bulletin of Endemic Diseases*, **14**: 73-81.
- ALCAIDE, M. (2005). *Respuesta inmune celular y humoral del porcino ibérico frente a la metastrongylosis*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 310 pp.
- ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. (2008). Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **15**: 349-358.
- ANÓNIMO (1983). *Erradication du varron en Bourgogne*. Ed. Ministerio de Agricultura. Servicios Veterinarios del Consejo Regional de Borgoña. 22 pp.
- ARAUJO-CHAVERON, N. (1994). *Etude d'*Hypoderma lineatum* (de Villers 1789): aspects épidémiologiques et interaction hôte-parasite*. Tesis Doctoral. Universidad de Berna.
- ARRU, E.; LEONI, A.; GARIPPA, G.; RASSU, A. (1985). Ipodermosi bovina: Localizzazione stagionale delle larve e lesioni anatomo-patologiche. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, **17**: 697-707.

- BAGLIONI, T.; AGNES, F.; SARTONELLI, P.; ARRIGOTI, C. (1987). Valutazione comparativa di alcuni parametri ematologici de ematochimici in manze de in vacche durante la gravidanza e la lattazione. *Clinica Veterinaria*, **110** (4): 247-256.
- BALDWIN, C.L.; TEALE, A.J.; NAESSENS, J.G.; GODDEERIS, B.M.; MACHUGH, N.D.; MORRISON, W.I. (1986). Characterization of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT4 by monoclonal antibodies and function: similarity to lymphocytes defined by human T4 and murine L3T4. *Journal of Immunology*, **136** (12): 4385-4391.
- BALDWIN, C.L.; MACHUGH, N.D.; ELLIS, J.A.; NAESSENS, J.; NEWSON, J.; MORRISON, W.I. (1988). Monoclonal antibodies which react with bovine T-lymphocyte antigens and induce blastogenesis: tissue distribution and functional characteristics of the target antigens. *Immunology*, **63**: 439-446.
- BARON, R.W. (1987). Inhibition of the bovine response by warble grub infestations. *Research Highlights*, **88**: 42-44.
- BARON, R.W. (1990). Cleavage of purified bovine complement component C3 in larval *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) hypodermis. *Journal of Medical Entomology*, **27** (5): 899-904.
- BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1986). Immunization of cattle against hypodermatosis by *Hypoderma lineatum*; deVill. and *H. bovis* (L.) using *H. lineatum* antigens. *Veterinary Parasitology*, **21** (1): 43-50.
- BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1987a). Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **21**: 43-50.
- BARON, R.W.; WEINTRAUB, J. (1987b). Immunological responses to parasitic arthropods. *Parasitology Today*, **3** (3): 77-82.

- BARON, R.W.; COLWELL, D.D. (1991a). Mammalian immune responses to myiasis *Parasitology Today*, **7** (12): 353-355
- BARON, R.W.; COLWELL, D.D. (1991b). Enhanced resistance to the grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). *Veterinary Parasitology*, **38**: 185-197.
- BARQUET, P.; CHABAUDIE, N.; NICOLAS, I.; BOULARD, C. (1992). Action des hypodermes sur la migration et l'expression des neutrophiles bovins. *Journées d'animation scientifique, INRA, Maisons-Alfort*.
- BARRAL, B. (2000). *Estudio del perfil de las IgM e IgG totales y las subclases IgG1 e IgG2 en la hipodermosis bovina*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 135 pp.
- BARRETT, C.C. (1981). A new technique for collecting cattle grub larvae. *The Southwestern Entomologist*, **6**: 144-146.
- BEESLEY, W.N. (1962). Observations on the development of *Hypoderma bovis* De Geer (Diptera, Oestridae) in the bovine host. *Research in Veterinary Science*, **3**: 203-208.
- BEESLEY, W.N. (1966). Further observations on the development of *Hypoderma lineatum*, Villiers and *Hypoderma bovis*, de Geer (Diptera: Oestridae) in the bovine host. *British Veterinary Journal*, **122**: 91-98.
- BENAKHLA, A.; BOULARD, C.; SEDRAQUI, S.; OUSSAID, F. (1993). L'hypodermose bovine: approche épidémiologique et caractérisation du cycle biologique en vue de l'établissement d'un plan de profilaxie dans le nord est Algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **144**: 693-700.

- BERKENKAMP, S.D.; DRUMMOND, R.O. (1990). Hypodermosis-part I + part II. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, **12**: 740-746 + 881-888.
- BEZILLE, P. (1993). Numération et formule leucocytaire chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, **25** (154): 285-287.
- BISHOPP, F.C.; LAAKE, E.W.; BRUNDRETT, H.M.; WELLS, R.W. (1926). The cattle grubs or Ox warbles, their biologies and suggestions for control. U.S. *Department of Agriculture Bulletin*, **1359**: 119.
- BOPPANA, D.K.; DHINAKAR, R.A.J.G.; JOHN, L.; WIKEL, S.K.; LATHA, B.R.; GOMATHINAYAGAM, S. (2004). *In vivo* immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes. *Parasite Immunology*, **26** (2): 83-93.
- BORCHERT, A. (1964). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza: 548-571.
- BOROS, D.L.; WHITFIELD, J.R. (1998). Endogenous IL-10 regulates IFN-gamma and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Immunology*, **94** (4): 481-487.
- BOSSAERT, K.; FARNIR, F.; LECLIPTEUX, T.; PROTZ, M.; LONNEUX, J.F.; LOSSON, B. (2000). Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **87** (2-3):103-123.
- BOULARD, C. (1968). Différenciation et développement des gonades mâles et femelles chez les larves d'*Hypoderma lineatum*. *Annales de la Société Entomologique Française (new series)*, **5** (2): 349-364.
- BOULARD, C. (1969). Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d'*Hypoderma bovis* (Diptères, Oestriiformes). *Annales de la Société entomologique Française (new series)*, **5** (2): 371-387.



- BOULARD, C. (1970). Etude préliminaire d'une collagénase brute extraite de la larve de premier stade d'*Hypoderma lineatum* (De Villers). *Compte Rendu de l'Académie des Sciences*, Paris, **270**: 1349-1351.
- BOULARD, C. (1975). Modifications histologiques de la sous-muqueuse oesophagienne de bovins parasités par *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera Oestriforme). *Annales de Recherche Vétérinaire*, **6** (2): 131-142.
- BOULARD, C. (1979). Circulating antibodies and blood histamine in cattle after treatment against hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **5**: 379-387.
- BOULARD, C. (1984). Effect of dose and route of application on the action of decametrin against cattle grubs. *Veterinary Parasitology*, **14**: 65-74.
- BOULARD, C. (1985). Avantages de l'immunodiagnostic de l'hypodermose bovine établi par hemagglutination passive et par ELISA à partir du sérum et du lactosérum sur la numération des varrons. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **16**: 335-343.
- BOULARD, C. (1989). Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **20**: 387-398.
- BOULARD, C.; WEINTRAUB, J. (1973). Immunological responses of rabbits artificially infested with the cattle grubs *Hypoderma bovis* (L.) and *H. lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae). *International Journal for Parasitology*, **3**: 379-386.
- BOULARD, C.; PETITHORY, J. (1977). Serological diagnosis of human hypodermosis: a preliminary report. *Veterinary Parasitology*, **3**: 259-263.
- BOULARD, C.; GARRONE, R. (1978). Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Hypoderma lineatum* (Insecta: Diptera, Oestriform). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **59b**: 251-255.

- BOULARD, C.; LECROISEY, A. (1982). Specific antisera produced by direct immunization with slices of polyacrylamide gel containing small amounts of protein. *Journal of Immunological Methods*, **50**: 221-226.
- BOULARD, C.; BENCHARIF, F. (1984). Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae) larval proteinases in naive and immune cattle. *Parasite Immunology*, **6** (5): 459-467.
- BOULARD, C.; VILLEJOURBERT, C. (1991). Used of pooled serum or milk samples for the epidemiological surveillance of bovine hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **39**: 171-183.
- BOULARD, C.; SORIA, J.; SORIA, C. (1970). Possibility to use passive hemagglutination test for diagnosis of hypodermmyiasis, using as antigen a raw collagenase extracted from 1st stage larvae of *Hypoderma lineatum*. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles*, **270** (15): 1965-1968.
- BOULARD, C.; ARGENTE, G.; HILLION, E. (1988a). Hypodermose bovine. 1<sup>e</sup> partie: description et incidence économique. *Le Point Vétérinaire*, **20** (111): 17-30.
- BOULARD, C.; ARGENTÉ, G.; HILLION, E. (1988b). Hypodermose bovine: 2<sup>e</sup> partie: diagnostic et traitement. *Le Point Vétérinaire*, **20** (112): 17-27.
- BOULARD, C.; ARGENTE, G.; HILLION, E. (1991). Effects indésirables des antiparasitaires (hypersensibilité). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **167** (12): 1127-1132.
- BOULARD, C.; BANTING, A.L.; CARDINAUD, B. (1998). Activity of moxidectin 1% injectable solution against first instar *Hypoderma* spp. in cattle and effects on antibody kinetics. *Veterinary Parasitology*, **77** (2-3): 205-210.

- BOWLES, V.M.; GREY, S.T.; BRANDON, M.R. (1992). Cellular immune responses in the skin of sheep infected with larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. *Veterinary Parasitology*, **44**: 151-162.
- BOWLES, V.M.; MEEUSEN, E.N.; CHANDLER, K.; VERHAGEN, A. NASH, A.D., BRANDON, M.R. (1994). The immune response of sheep infected with larvae of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* monitored via efferent lymph. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **40**: 341-352.
- BREEV, K.A. (1971). On some common principles for control measures against parasitic arthropods (on the example of warble flies). *Entomology obozreniye*, **2**: 249-266.
- BREEV, K.A.; ZAGRETDINOV, R.G.; MINAR, J. (1980). Influence of constant and variable temperatures on pupal development on the sheep bot fly (*Oestrus ovis* L.). *Folia Parasitologica*, **27**: 359-365
- BROADMEADOW, M. (1984). Pathogenesis of blowfly strike in sheep. *Wool Technology and Sheep Breeding*, **32**: 28-32.
- CARBALLO, D. (1999). *Valoración mediante ELISA e inmunoelectrotransferencia de un antígeno recombinante para el diagnóstico de la hipodermosis bovina*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 91 pp.
- CASAI, R.; MARTÍN ALONSO, J.M.; BOGA, J.A.; PARRA, F. (1998). *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hipodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Experimental Parasitology*, **90** (1): 14-19.
- CASTILLO, M.T. (2003). *Detección de antígenos de Hypoderma spp. mediante ELISA doble basado en el empleo de anticuerpos mono y policlonales*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 166 pp.

- CHABAUDIE, N. (1987). *Mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire des enzymes d'hypoderme à l'aide d'un modèle murin*. Memoria para la obtención del Diplôme d'Etudes approfondies, especialidad: biofísicoquímica y biología celular y molecular. Universidad de Tours.
- CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1992). Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **31** (1-2): 167-177.
- CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. (1993). *In vitro* and *ex vivo* responses of bovine lymphocytes to hypodermin C, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **36**: 153-162.
- CHABAUDIE, N.; VILLEJOURBERT, C.; BOULARD, C. (1991). The response of cattle vaccinated with hypodermin A to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *International Journal for Parasitology*, **21** (7): 859-862.
- CHAMBERLAIN, W.F. (1964). Survival of first-instar common cattle grubs under anaerobic conditions *in vitro*. *Annals of the Entomological Society of America*, **57**: 799-800.
- CHAMBERLAIN, W.F. (1989). Survival of second and third instars of the cattle grubs, *Hypoderma lineatum* (Villers) and *Hypoderma bovis* (L.), in artificial media. *The Southwestern Entomologist*, **14**: 233-239.
- CHARBON, J.L.; PFISTER, K. (1992). Hypodermosis in Switzerland. Editado por: HERNÁNDEZ, S.; GASCA, A.; MARTÍNEZ, J.; PITHAN, J. *Improvements in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats, Commission of the European Communities*, Córdoba: 45-50.
- CHAUVIN, A. (1987). *Application de la méthode immunoenzymatique ELISA au diagnostic de l'hypodermose bovine*. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina de Nantes. 102 pp.

- CHAUVIN, A.; ARGENTE, G.; BOULARD, C. (1988). Utilisation pratique dans la lutte contre cette affection. Les méthodes de diagnostic de l'hypodermose. *Revue of Médecine Vétérinaire*, **139**: 521-527.
- CHEVILLARD, C.; MOUKOKO, C.E.; ELWALI, N.E.; BREM, J.H.; KOURIBA, B.; ANGIRO, L.; RAHOUD, S.; MERGANI, A. (2003). Interferon gamma polymorphisms are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). *Journal of Immunology*, **171** (10): 5596-5601.
- CLAEREBOUT, E.; VERCAUTEREN, I.; GELDHOF, P.; OLBRECHTS, A.; ZARLENGA, D.S.; GODDEERIS, B.M.; VERCRUYSE, J. (2005). Cytokine responses in immunized and non-immunized calves after *Ostertagia ostertagi* infection. *Parasite Immunology*, **27**: 325-331.
- CLERY, D.; TORGERSON, P.; MULCAHY, G. (1996). Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **62** (1-2): 71-82.
- COGLEY, T.P.; ANDERSON, J.R. (1981). Invasion of black-tailed deer by mose bot fly larvae (Diptera: Gasterophilidae) in the equine oral cavity. *International Journal for Parasitology*, **12**: 473-480.
- COLDITZ, I.G.; EISEMANN C.H.; TELLAM, R.L.; MCCLURE, S.J.; MORTIMER, S.I.; HUSBAND, A.J. (1996). Growth of *Lucilia cuprina* larvae following treatment of sheep divergently selected for fleece rot and fly strike with monoclonal antibodies to T lymphocyte subsets and interferon gamma. *International Journal for Parasitology*, **26** (7): 775-782.
- COLWELL, D.D. (1985). Cellular immunity in warble grub infestations: eosinophil responses to invading and migrating larvae. *Research Highlights*, **86**: 44-46.
- COLWELL, D.D. (1989). Scanning electron microscopy of the posterior spiracles of cattle grubs *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**: 391-398.

- COLWELL, D.D. (1991). Ultrastructure of the integument of first-instar *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae). *Journal of Medical Entomology*, **28** (1): 86-94.
- COLWELL, D.D. (2001). Stage specific mortality and humoral immune responses during pulse and trickle infestations of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **99** (3): 231-239.
- COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1988). Early detection of cattle grub infestations using ELISA technique. *Research Highlights*: 28-29.
- COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1990). Early detection of cattle grub (*Hypoderma lineatum* and *H. bovis*) (Diptera, Oestridae) using ELISA. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 35-42.
- COLWELL, D.D.; BERRY, N.M. (1993). Tarsal sensilla of the warble flies *Hypoderma bovis* and *H. lineatum* (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **86** (6): 756-765.
- COLWELL, D.D.; BARON, R.W.; LYSYK, T.J. (1997). Influence of parasiticide treatment on kinetics of antigens specific antibody response in cattle infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **68**: 117-186.
- COLWELL, D.D.; LÓPEZ, C.; DIEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PANADERO, R. (2008). Impact of previous infestation on dynamics of circulating hypodermin C in cattle artificially infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **154** (1-2): 114-121.
- COLWELL, D.D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; DE LA FUENTE-LÓPEZ, C.; ALUNDA, J.M.; HALL, M.J. (1998). Comparative scanning electron microscopy of third-instar *Hypoderma* spp. (Diptera: Oestridae). *Medical and Veterinary Entomology*, **12** (2): 181-186.

- COLWELL, D.D.; PANADERO-FONTAN, R.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; PARRA-FERNÁNDEZ, F.; PAZ-SILVA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2003). Effect of treatment on the dynamics of circulating hypodermin C in cattle naturally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **113** (3-4): 263-272.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1962). Ensayos con “Neguvón” y “Trolene” sobre ganado vacuno. *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*, **VIII**: 11-37.
- COX, D.D.; MOZIER, J.O.; MULLEE, M.T. (1970). Posterior paralysis in a calf caused by cattle grubs (*Hypoderma bovis*) after treatment with systemic insecticide for grub control. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **157** (8): 1088-1092.
- D’ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**: 1041.
- DACAL, V. (2006). *Producción de Interferón Gamma por linfocitos estimulados con antígeno de Hypoderma lineatum*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 126 pp.
- DACAL, V. (2009). *Respuesta celular cutánea y producción de citoquinas como factores determinantes de protección en la infestación por Hypoderma sp.* Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 248 pp.
- DACAL, V.; COLWELL, D.D.; LÓPEZ, C.; PÉREZ, V.; VÁZQUEZ, L.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; PANADERO, R. (2009). Local and systemic cytokine responses during larval penetration in cattle experimentally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **131** (1-2): 59-64

- DAVIS, W.C.; ELLIS J.A.; MACHUGH N.D.; BALDWIN C.L. (1988). Bovine pan T-cell monoclonal antibodies reactive with a molecule similar to CD2. *Immunology*, **63** (1): 165-167.
- DAVIS, W.C.; MARUSIC, S.; LEWIN, H.A.; SPLITTER, G.A.; PERRYMAN, L.E.; MCGUIRE, T.C.; GORHAM, J.R. (1987). The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **15** (4): 337-376.
- DE SMEDT, T.; VAN MECHELEN, M.; DE BECKER, G.; URBAIN, J.; LEO, O.; MOSER, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology*, **27** (5): 1229-1235.
- DÍEZ, P.; MORRONDO, P.; GOICOA, A.; PANADERO, R. (1992). Inmunodiagnóstico por ELISA indirecto de la infestación por *Hypoderma* en bovinos de la provincia de Lugo. *IX Reunión Científica de la Asociación de Parasitólogos Españoles*: 89.
- DÍEZ, P.; PANADERO, R.; MORRONDO, P.; LÓPEZ, C.; DÍEZ, N. (1995). Hipodermosis. *Bovis (Tratado de Veterinaria Práctica)*, **65**: 1-90.
- DOBY, J.M.; ROSIN, G.; DEUNFF, J.; AZNAR, C. (1986). L'électrosynérèse dans le diagnostic immunologique de l'hypodermose humaine. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **4** (1): 137-143.
- DOBY, J.M.; QUILICI, M.; MARY, C.; DEUNFF, J. (1987a). Valeur comparée de l'immunoélectrophorèse et de l'ELISA dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Pathologie and Biologie*, **35** (4): 381-385.



- DOBY, J.M.; QUILICI, M.; SENET, J.M.; LEYNIA DE LA JARRIGE, P.; MARY, C. (1987b). Évolution des anticorps dans l'hypodermose humaine. Étude en parallèle par immuno-électrophorèse, ELISA et hemagglutination passive. Relations avec hypereosinophilie sanguine et manifestations cliniques. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **5** (1): 113-121.
- DORCHIES, P.; DURANTON, C.; JACQUIET, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *The Veterinary Record*, **142** (18): 487-489.
- DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. (1986). *Veterinary Laboratory Medicine*. Ames, Iowa State University Press.
- DURANTON, C.; DORCHIES, P. (1997). In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linné 1761) first instar larvae: its application to antiparasitic drug screening. *International Journal for Parasitology*, **27** (1):125-128.
- DURIN, L.; PÉRÈS, G. (1953). Lésions médullaires graves causées par des larves d'hypodermose sur un taureau. *Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires de Lyon*, **1**: 111-112.
- ELHAY, M.J.; HANRAHAN, C.F.; BOWLES, V.M.; SEOW, H.F.; ANDREWS, A.E.; NASH, A.D. (1994). Cytokine mRNA expression in skin in response to ectoparasite infection. *Parasite Immunology*, **16** (9): 451-461.
- ELLIS, J.A.; BALDWIN, C.L.; MACHUGH, N.D.; BENSAID, A.; TEALE, A.J.; GODDEERIS, B.M.; MORRISON, W.I. (1986). Characterization by a monoclonal antibody and functional analysis of a subset of bovine T lymphocytes that express BoT8, a molecule analogous to human CD8. *Immunology*, **58** (3): 351-358.
- ESTES, D.M.; BROWN, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **90** (1-2): 1-10.

- EVSTAF'EV, M.N. (1980). Role of immunity in hypodermiasis in cattle. *Parazitologiya*, **14** (3): 197-205.
- EYRE, P.; BOULARD, C.; DELINE, T.R. (1981). Reaginic (type I anaphylactic) antibodies produced by calves in responses to *Hypoderma* larvae. *The Veterinary Record*, **107**: 280-281.
- FERNÁNDEZ, M. (2005). *Incidencia y desarrollo de las larvas 1 de Hypoderma lineatum en el esófago de ganado vacuno del Noroeste de España*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 115 pp.
- FERNÁNDEZ, M.; DACAL, V.; VÁZQUEZ, L.; LÓPEZ, C.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P. (2005). Prevalencia y desarrollo de las larvas 1 de *Hypoderma lineatum* en el esófago de ganado vacuno del Noroeste de España. *VI Jornadas Internacionales de Ganado Vacuno*: 235-239.
- FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **64** (3): 279-293.
- FISHER, W.F.; PRUETT, J.H.; HOWARD, V.M.; SCHOLL, P.J. (1991). Antigen-specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *Hypoderma lineatum*-infested calves. *Veterinary Parasitology*, **40** (1-2): 135-145.
- FLYNN, R.J.; MULCAHY, G. (2008). The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1673-1680.
- FOLSTAD, Y.; NILSSEN, A.C.; HALVORSEN, O.; ANDERSEN, J. (1989). Why do male reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) have higher abundance of second and third instar larvae of *Hypoderma tarandi* than females? *Oikos*, **55**: 87-92.

- FONG, T.A.; MOSMANN T.R. (1990). Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *Journal of Immunology*, **144** (5): 1744-1752.
- FONSECA, L.; SEIXAS, E.; BUTCHER, G.; LANGHORNE, J. (2007). Cytokine responses of CD4+ T cells during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* (ER) blood-stage infection in mice initiated by the natural route of infection. *Malaria Journal*, **6**: 77.
- FRANCART, J. (1978). *Étude des accidents consécutifs au traitement précoce de l'hypodermose bovine par les composés organophosphorés*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria Alfort. 95 pp.
- GHEGARIU, S.; ROWLAND, G.S.; POP, A.; DANIELESCU, N.; MOLDOVAN, A. (1984). A comparative study of metabolic profiles obtained in dairy herds in Romania. *The British Veterinary Journal*, **140** (6): 600-608.
- GIL-COLLADO, M. (1961). *Insectos y ácaros de los animales domésticos*. Edit. Salvat, Barcelona.
- GINGRICH, R.E. (1970). Survival of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) implanted in heterologus murine hosts. *Journal of Medical Entomology*, **7** (2): 256-260.
- GINGRICH, R.E. (1980). Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **7**: 243-254.
- GINGRICH, R.E. (1982). Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: Comparative immune response of resistant and susceptible cattle. *Veterinary Parasitology*, **9**: 233-242.
- GIRONÈS, N.; VALERO, M.A.; GARCÍA-BODELÓN, M.A. CHICO-CALERO, I.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M.; MAS-COMA, S. (2007). Immune suppression in advanced chronic fascioliasis: an experimental study in a rat model. *Journal of Infectious Diseases*, **195** (10): 1504-1512.

- GODDARD, P.; BATES, P.; WEBSTER, K.A. (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. *The Veterinary Record*, **144** (18): 497-501.
- GODON, C. (1994). *Exploration de la migration des leucocytes de bovines au cours de la phase précoce d'une primoinfestation par les larves d'Hypoderma lineatum*. Thèse pour le diplôme d'Etat. France, Université François Rabelais.
- GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; HORN, R.H.; BARRINGTON, G.M.; KNOWLES, P.P. (2003). The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type 1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunology*, **25** (4): 185.
- GONÇALVES, J.M.; PEREIRA, M.C.; EVANGELISTA, L.G.; LEITE, A.C. (2007). Expression of circulating leucocytes before, during and after myiasis by *Dermatobia hominis* in experimentally infected rats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **49** (5): 289-292.
- GRENCIS, R.K. (1997). Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, **352** (1359): 1377-1384.
- HADWEN, S.; FULTON, J.S. (1924). On the migration of *Hypoderma lineatum* from the skin to the gullet. *Parasitology*, **16**: 98-106.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, **88**: 343-352.
- HEIN-KRISTENSEN, L.; WIESE, L.; KURTZHALS, J.A.; STAALSOE, T. (2009). In-depth validation of acridine orange staining for flow cytometric parasite and reticulocyte enumeration in an experimental model using *Plasmodium berghei*. *Experimental Parasitology*, **123**: 152-157.

- HELMBY, H.; GRENCIS, R.K. (2003). IFN-gamma-independent effects of IL-12 during intestinal nematode infection. *Journal of Immunology*, **171** (7): 3691-3696.
- HIEPE, T.H.; RIBBECK, R.; GAHTOW, I.; GRAMANN, F.; HORST, J. (1969). Zur dynamik des befalls der rinder mit *Hypoderma bovis* De Geer, 1976. 2. mitteilung: vorkommen von larven I im wirbelkanal und lokalisation der dasselbeulen bei den rindern. *Sonderdruck aus, Monatshefte für Veterinärmedizin*, **8**: 289-293.
- HURTADO, F. J. (1999). *Establecimiento de las bases epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de la hipodermosis bovina en Extremadura (España)*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 237 pp.
- JOHNSON, D.R.; SALES, J.; MATTHEWS, J.B. (2005). Local cytokine responses in *Dictyocaulus viviparus* infection. *Veterinary Parasitology*, **128** (3-4): 309-318.
- JONGH, O. (1993). Les variations quantitatives de la population leucocytaire sanguine. *Le Point Vétérinaire*, **10**: 681-684.
- KARTER, A.J.; FOLSTAD, I.; ANDERSON, J.R. (1992). A biotic factors influencing embryonic development egg hatching and larval orientation in the reindeer warble fly *Hypoderma tarandi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **6**: 355-362.
- KASTING, R.; MCGINNIS, J.A. (1966). Amino acid requeriments of *Hypoderma bovis* (L.), determined with glucose-U14C. *Experimental Parasitology*, **19**: 249-253.
- KETTLE, D.S. (1990). *Medical and Veterinary Entomology*. Ed. CAB International: 267-273.
- KHAN, M.A. (1971). Some factors involved in systemic insectidice toxicosis: esophageal lesions in heifers treated with coumaphos, crufonate and trichlorofon. *Canadian Journal of Animal Science*, **51**: 411-417.

- KHAN, M.A. (1981). An intradermal test to detect latent warble (*Hypoderma* spp.) infection in cattle. *Canadian Veterinary Journal*, **22**: 36-41.
- KHAZNADJI, E.; BOULARD, C.; MOIRÉ, N. (2003). Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. *Experimental Parasitology*, **104** (1-2): 33-39.
- KOPECKÝ, J.; KUTHEJLOVÁ, M.; PECHOVÁ, J. (1999). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology*, **21**: 351.
- KOVÁR, L.; KOPECKÝ, J.; RÍHOVÁ, B. (2002). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research*, **88** (12): 1066-1072.
- LALLI, P.N.; MORGAN, M.S.; ARLIAN, L.G. (2004). Skewed Th1/Th2 immune response to *Sarcoptes scabiei*. *The Journal of Parasitology*, **90** (4): 711-714.
- LAMBERT, C. (1990). Le laboratoire au service du vétérinaire clinicien. *Bulletin des G.T.V.*, **2**: 75-95.
- LAPAGE, G. (1968). *Veterinary Parasitology*. Edinburgh: Oliver and Boyd Edit.: 511-524.
- LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M. (1989). Clinical interpretation of leucocytes response. *Small Animal Practice*, **19** (14): 637-668.
- LECADRE, P. (1985) *Exploration de la migration des neutrophiles bovins au cours de la phase précoce d'une primo-infestation par les larves d'Hypoderma lineatum*. Mémoire de fin d'étude INA Paris-Grignon.
- LECROISEY, A.; KEIL, B. (1985). Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *European Journal of Biochemistry*, **152**: 123-130.

- LECROISEY, A.; BOULARD, C.; KEIL, B. (1979). Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *European Journal of Biochemistry*, **101**: 385-393.
- LECROISEY, A.; TONG, N.T.; KEIL, B. (1983). Hypodermin B a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with Hypodermin A and *Hypoderma* collagenase, two serine proteases from the same source. *European Journal of Biochemistry*, **134**: 261-267.
- LECROISEY, A.; GILLES, A.M.; DE WOLF, A.; KEIL, B. (1987). Complete aminoacid sequence of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**: 7546-7551.
- LEDBETTER, J.A.; EVANS, R.L.; LIPINSKI, M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; GOOD, R.A.; HERZENBERG, L.A. (1981). Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *The Journal of Experimental Medicine*, **153** (2): 310-323.
- LEVASSEUR, G. (1991) Incidents dus à *Hypoderma lineatum*, lors du traitement précoce du varron. *Bulletin des G.T.V.*, **6B** (410): 189-191.
- LONNEUX, J.F.; LOSSON, B.J. (1994). The efficacy of moxidectin 0,5% pour-on against *Hypoderma bovis* in naturally infected cattle: parasitological and serological data. *Veterinary Parasitology*, **52** (3-4): 313-320.
- LONNEUX, J.F.; LOSSON, B.; POUPLARD, L. (1991). Données récentes sur l'hypodermose bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **135**: 7-14.
- LÓPEZ, C.; COLWELL, D.D.; PANADERO, R.; PAZ, A.; PÉREZ, J.; MORRONDO, P.; DíEZ, P.; CASCALLANA, J.L.; SANTAMARÍA, V.; BRAVO, A. (2005). Skin immune responses in cattle after primary and secondary infections with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108** (3-4): 285-294.

- LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; BRAVO, A.; DÍEZ, P. (1999a). Estudio anatomopatológico del tejido subcutáneo en bovinos infestados por *Hypoderma* spp.. *VI Congreso Ibérico de Parasitología*: 140.
- LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; BRAVO, A.; DÍEZ, P.; LEIS, H.; MORRONDO, P.; DÍEZ, P. (1999b). Cambios histopatológicos en la submucosa esofágica de bovinos infestados por *Hypoderma lineatum*. *VI Congreso Ibérico de Parasitología*: 143.
- LOSSON, B.J.; LONNEUX, J.F. (1991). Hypodermose bovine: Évaluation préliminaire de la technique ELISA en vue du dépistage précoce de l'affection. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **135**: 373-375.
- LYSYK, T.J.; COLWELL, D.D.; BARON, R.W. (1991). A model for estimating abundance of cattle grub (Diptera: Oestridae) from the proportion of uninfested cattle as determined by serology. *Medical and Veterinary Entomology*, **5**: 253-258.
- MACOVEI, N.; GRICORE, C.; GOLUMBOVINI, E.; CRISTESCU, P.; COSTEA, V. MAGUREANU, P.; VOICU, G.; CONTOTA, N. (1986). Valori di referinta ale unor parametric biochemical si hematologici la taurine. *Lucranite Institute Cercetari Veterinari Biopreparate Pasteur*, **17**: 73-87.
- MAGAT, A.; BOULARD, C. (1970). Essais de vaccination contre l'hypodermose bovine avec un vaccine contenant une collagénase brute extradite des larves de 1er stade d'*Hypoderma lineatum*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, Paris, **270**: 728-730.
- MARCATO, A. (1990). *Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos*. McGraw Hill, Madrid, 2ª edición.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; HERNANDEZ, S.; MORENO, T. (1988). Ectoparasitosis II. Hipodermosis. *Bovis (Tratado de medicina veterinaria)*, **25**: 35-86.



- MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; GASCA-ARROYO, A.; DE JUAN, F.; HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. (1991). Maternal anti-*Hypoderma* antibodies in calves. *Medical and Veterinary Entomology*, **5** (3): 381-383.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J. (1992). *Estudio inmunológico de la hipodermosis bovina*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 109 pp.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; WASSALL, D.A.; BECERRA, C.; HERNANDEZ, S. (1994). Comparison of the use of secretory and somatic antigens in an ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **52**: 321-329.
- MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; BECERRA, C.; JIMENEZ, V.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, S.; HERNANDEZ, S. (1995). Prevalencia de la hipodermosis bovina en el valle del Guadalquivir. *Medicina Veterinaria*, **12** (3): 168-178.
- MBOW, M.L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. (1994). Infiltration of CD4+ CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, antigens, IL-1 alpha and TNF-alpha in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology*, **82** (4): 596-602.
- McELROY, M.C.; BASSETT, H.F.; MONAGHAN, M.L.; DAVIS, W.C. (1998). The distribution of lymphocyte subsets in normal ovine skin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **62** (1): 65-71.
- McKEAND, J.B.; DUNCAN, J.L.; URQUHART, G.M.; KENNEDY, M.W. (1996). Isotype-specific antibody responses to the surface-exposed antigens of adult and larval stages of *Dictyocaulus viviparus* in infected and vaccinated calves. *Veterinary Parasitology*, **61** (3-4): 287-295.
- McKERROW, J.H. (1986). Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *International Journal for Parasitology*, **29** (6): 833-837.

- MENARD, L.C.; MINNS, L.A.; DARCHE, S.; MIELCARZ, D.W.; FOUREAU, D.M.; ROOS, D.; DZIERZINSKI, F.; KASPER, L.H.; BUZONI-GATEL, D. (2007). B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. *Journal of Immunology*, **179** (7): 4857-4866.
- MENTEN-DEDOYART, C.; COUVREUR, B.; THELLIN, O.; DRION, P.; HERRY, M.; JOLOIS, O.; HEINEN, E. (2008). Influence of the *Ixodes ricinus* tick blood-feeding on the antigen-specific antibody response in vivo. *Vaccine*, **26** (52): 6956-6964.
- MILLER, R.; WEN, X.; DUNFORD, B.; WANG, X.; SUZUKI, Y. (2006). Cytokine production of CD8+ immune T cells but not of CD4+ T cells from *Toxoplasma gondii*-infected mice is polarized to a type 1 response following stimulation with tachyzoite-infected macrophages. *Journal of interferon & cytokine research*, **26**: 787-792.
- MILNES, A.S.; BAILEY, M.; KNOWLES, T.G.; COLES, G.C.; GREEN, L.E.; DAY, M.J. (2007). An immunohistochemical assessment of the cutaneous immune response to louse infestation in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, **136** (4): 240-249.
- MINÁR, J.; BREEV, K.A. (1982). Laboratory and field rearing of the warble fly *Hypoderma bovis* (De Geer) (Diptera, Hypodermatidae) in the research of its population ecology. *Folia Parasitologica*, **29** (4): 351-360.
- MOBERG, R. (1995). *The white blood picture sexually-mature female cattle with special reference to sexual conditions. A clinical experimental study*. Tesis doctoral. Universidad de Estocolmo.
- MOIRÉ, N.; BIGOT, Y.; PERIQUET, G.; BOULARD, C. (1994). Sequencing and gene expression of hypodermins A, B, C in larval stages of *Hypoderma lineatum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **66**: 233-240.
- MOIRÉ, N.; NICOLAS-GAULARD, I.; LE VERN, Y.; BOULARD, C. (1997). Enzymatic effect of hypodermin A, a parasite protease, on bovine lymphocyte membrane antigens. *Parasite Immunology*, **19**: 21-27.

- MONFRAY, K.; BOULARD, C. (1990). Preliminary evaluation of four immunological tests for the early diagnosis of *Hypoderma tarandi* causing hypodermosis in reindeer. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**: 297-302.
- MORRONGO, P. (1998). *Estudio sobre la hipodermosis bovina en Galicia mediante determinación sérica de anticuerpos frente a hipodermina C*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 106 pp.
- MORRONGO, P.; DíEZ, N.; LÓPEZ, C.; DíEZ, P.; PANADERO, R. (1999). Estudio inmuno-epidemiológico de la hipodermosis bovina en Galicia. *Producción Animal*, **143**: 31-43.
- MOSMANN, T.R. (1994). Properties and functions of interleukin-10. *Advances in Immunology*, **56**: 1-26.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* **136** (7): 2348-2357.
- MÜLLER, I.; KROPF, P.; LOUIS, J.A.; MILON, G. (1994). Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, **62**: 2575-2581.
- MULCAHY, G.; O'CONNOR, F.; McGONIGLE, S.; DOWD, A.; CLERY, D.G.; ANDREWS, S.J.; DALTON, J.P. (1998). Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, **16**: 932-939.
- NASH, A.D.; EGAN, P.J.; KIMPTON, W.; ELHAY, M.J.; BOWLES, V.M. (1996). Local cell traffic and cytokine production associated with ectoparasite infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **54** (1-4): 269-279.

- NAVARRETE, I.; REINA, D.; HERNÁNDEZ, S.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.J.; GALEANO, C. (1993). Preliminary studies on bovine Hypodermosis in the province of Cáceres (Spain). Editado por: LOSSON, B.; LONNEUX, J.F.; PITHAN, K. *Improvements in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats*, Commision of the European Communities, Liege: 3-11.
- NELSON, W.A. (1987). *Immune responses in Parasitic Infections, Protozoa, Arthropods and Invertebrates*. Ed. Soulsby C.R.C. Press, Boca Ratón, **4**: 175-209.
- NELSON, W.A.; KNAPP, F.W. (1961). A flocculation test for the detection of antibodies resulting from the injection of an extract of *Hypoderma* larvae. *American Journal of Veterinary Research*, **22** (87): 332-334.
- NELSON, W.A.; WEINTRAUB, J. (1972). *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae): Invasion of the bovine skin by newly hatched larvae. *Journal of Parasitology*, **58** (3): 614-624.
- NICOLAS-GAULARD, I.; MOIRÉ, N.; BOULARD, C. (1995). Effect of the parasite enzyme, hypodermin A, on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. *Immunology*, **84**: 160-164.
- NILSSEN, A.C.; ANDERSON, J.R. (1995). Flight capacity of the reindeer warble fly, *Hypoderma tarandi* (L.) and the reindeer nose bot fly, *Cephenemia trompe* (Modeer) (Diptera: Oestridae). *Canadian Journal of Zoology*, **73**: 1228-1238.
- OKUNEV, A.M. (1990). Ocurrance of larvae of *Fannia* flies in the prepupa of *Hypoderma bovis*. *Parazitologiya*, **24** (5): 417-419.
- OLIN, M.R.; HWA-CHOI, K.; LEE, J.; MOLITOR, T.W. (2005). Gammadelta T-lymphocyte cytotoxic activity against *Mycobacterium bovis* analyzed by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, **297** (1-2): 1-11.

- OLTNER, R.; BERGLUND, B. (1983). Leukocytes, packed cell volume, glucose, urea, calcium, inorganic phosphorus and magnesium in the blood of dairy cows. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, **30**: 530-541.
- ORFAO, A.; GONZALEZ DE BUITRAGO, J.M. (1995). *La citometría en laboratorio clínico*. Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.
- OTRANTO, D.; COLWELL, D.D. (2005). *Hypoderma sinense*: a debated issue. *Veterinary Parasitology*, **128** (3-4): 353-354.
- OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; TARSITANO, E.; STEVENS, J. (2003). Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Veterinary Parasitology*, **112** (3): 197-201.
- OTRANTO, D.; TESTINI, G.; SOTTILI, R.; CAPELLI, G.; PUCCINI, V. (2001). Screening of commercial milk samples using ELISA for immunoepidemiological evidence of infection by the cattle grub (Diptera: Oestridae). *Veterinary Parasitology*, **99** (3): 241-248.
- OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; MILILLO, P.; DE LUCA, F.; STEVENS, J. (2005). Utility of mitochondrial and ribosomal genes for differentiation and phylogenesis of species of gastrointestinal bot flies. *Journal of Economic Entomology*, **98** (6): 2235-2245.
- OTRANTO, D.; TRAVERSA, D.; COLWELL, D.D.; GUAN, G.; GIANGASPERO, A.; BOULARD, C.; YIN, H. (2004). A third species of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) affecting cattle and yaks in China: molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology*, **90** (5): 958-965.
- OZAKI, K.; LEONARD W.J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. JBC Papers in Press. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (33): 29355-29358.

- PANADERO, R. (1996). *Estudio epidemiológico y de la respuesta inmune frente a antígeno de Hypoderma lineatum como aportación a la lucha contra la hipodermosis bovina en Galicia*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 256 pp.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DíEZ, P.; MORRONDO, P. (1993). Variaciones anuales de la respuesta inmune en hipodermosis bovina. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **1** (2): 102.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DíEZ, P.; MORRONDO, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (1994a). Seroprevalence of *Hypoderma lineatum* (De Villiers, 1789) detected by indirect ELISA on cattle in Lugo province (N.W. Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, **54** (2): 129-132.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; MEZO, M.; MORRONDO, P.; DíEZ- BAÑOS, P. (1997). Effect of early treatment with ivermectin and doramectin on the dynamics of antibody response in cattle naturally infested by *Hypoderma lineatum* and *H. bovis*. *Veterinary Parasitology*, **73**: 325-334.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PAZ, A.; DíEZ, P.; MORRONDO, P. (1998). Estudio sobre el desarrollo de las larvas esofágicas de *Hypoderma lineatum* y su relación con el tratamiento precoz de la hipodermosis bovina en el Norte de España. *Veterinaria México*, **29**: 155-160.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; MORRONDO, P.; DíEZ, P.; CARRILLO, E.B.; PAZ, A. (1994b). Relación entre el número de larvas de *Hypoderma spp* en el dorso y la respuesta detectada por ELISA. *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, Sitges: 100.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; DíEZ, N.; PAZ, A.; DíEZ, P.; MORRONDO, P. (2000a). Influence of internal and environmental factors on the distribution and occurrence of *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) in cattle in Galicia (Northwest of Spain). *Journal of Medical Entomology*, **37** (1): 27-28.

- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PAZ, A.; DíEZ-BAÑOS, N.; MORRONDO, P.; DíEZ-BAÑOS, P. (2001). Dynamics of the antibody response in cattle infested by *Hypoderma* (Diptera: Oestridae) after a treatment with injectable and pour-on ivermectin. *Journal of Medical Entomology*, **38** (4): 603-605.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; PARRA, F.; MORRONDO, P.; DíEZ-BAÑOS, P.; COLWELL, D. (2002). Detection of circulating hypodermin C: an antigen capture ELISA for diagnosis of cattle grub (Diptera: Oestridae) infestations. *Veterinary Parasitology*, **108**: 85-94.
- PANADERO, R.; LÓPEZ, C.; CARBALLO, D.; CASAIS, R.; PAZ, A.; MORRONDO, P.; DíEZ-BAÑOS, P. (2000b). Assessment of a recombinant antigen versus natural hypodermin C for the serodiagnosis of hypodermosis in cattle. *Parasitology Research*, **86** (1): 67-68.
- PANADERO, R.; FERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, L.; LÓPEZ, C.; DACAL, V.; CIENFUEGOS, S.; DÍAZ, P.; MORRONDO, P.; DíEZ-BAÑOS, P. (2007). Occurrence and larval growth of *Hypoderma lineatum* in the oesophagi of cattle from northwest Spain: influence of geographical and climatic conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, **21** (3): 225-230.
- PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; JOHNSON, E.M.; WHITENACK, D.L. (1993). Eosinophilic mediastinitis, myositis, pleuritis, and pneumonia of cattle associated with migration of first-instar larvae of *Hypoderma lineatum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **5**: 226-231.
- PARK, Y.H.; FOX, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C. (1992). Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, **75**: 998-1006.
- PATTERSON, P.S.; BOSSHARDT, S.C.; UDHAYUKUMAR, U.; XIAO, L.; KIDD, M.; HUNTER, R.L.; LAL, A.A. (1999). Prolonged expression of interferon gamma induced by protective blood stage immunization against *Plasmodium yoelii* malaria. *Vaccine*, **18**: 173-180.

- PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO, R.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (1998). IgG isotype specific immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **79** (3): 229-237.
- PAZ, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PANADERO, R.; SUÁREZ, J.L.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P. (1999). Subclass profile of specific IgG antibodies in rats challenged during acute and chronic primary infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, **85** (8-9): 770-775.
- PECINALI, N.R.; GOMES, R.N.; AMENDOEIRA, F.C.; PEREIRA-BOSTOS, A.C.M.; MARTINS, M.J.Q.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. (2005). Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Veterinary Parasitology*, **134**: 121-130.
- PÉREZ, J.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; CARRASCO, L.; GUTIERREZ, P.N.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (1999). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes in goats infected with one or more doses of *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*, **120** (2): 199-210.
- PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; MORENO, T.; MORRONDO, P.; LÓPEZ-SÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2002). Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with *Fasciola hepatica*, with or without triclabendazole treatment. *Journal of Comparative Pathology*, **127** (1): 30-36.
- PÉREZ, J.; ORTEGA, J.; BRAVO, A.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (2005). Phenotype of hepatic infiltrates and hepatic lymph nodes of lambs primarily and challenge infected with *Fasciola hepatica*, with and without triclabendazole treatment. *Veterinary Research*, **36** (1): 1-12.



- PETITHORY, J.; BOULARD, C. (1979). Étude comparative des antigènes *H. bovis* et *H. lineatum* dans le diagnostic sérologique de l'hypodermose humaine. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **9** (7): 393-396.
- PFADT, R.E. (1947). Effect of temperature and humidity on larval and pupal stages of the common cattle grub. *Journal of Economic Entomology*, **40**: 293-300.
- PFADT, R.E.; LLOYD, J.E.; SHARAFI, G. (1975). Pupal development of cattle grubs at constant and alternating temperatures. *Journal of Economic Entomology*, **68** (3): 325-328.
- PHIRI, I.K.; PHIRI, A.M.; HARRISON, L.J. (2006). Serum antibody isotype responses of *Fasciola*-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology*, **141** (3-4): 234-242.
- POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. (1993). Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subset in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **49**: 179-190.
- PRIETO, M.; ESPI, M.; GARCIA, J.A.; PARRA, F. (1990). Effect of Ivermectin treatment on anty-hypodermin C Asturiana cattle naturally with *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **35**: 211-218.
- PRUETT, J.H. (1993). Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypodermin A, a serine protease of *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Parasitology*, **79** (6): 829-833.
- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1984). Induction of intradermal skin reactions in the bovine by fractionated proteins of *Hypoderma lineatum*. *Veterinary Parasitology*, **16**: 137-146.

- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C. (1985). Kinetic development of humoral anty-*Hypoderma lineatum* antibody activity in the serum of vaccinated and infested cattle. *Southwest Entomology*, **10**: 39-48.
- PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1989). Calostrual transfer of antibodies specific for *Hypoderma lineatum* proteins. *Veterinary Research Communications*, **13** (3): 213-223.
- PRUETT, J.H.; KUNZ, S.E. (1996). Thermal requirements for *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) egg development. *Journal of Medical Entomology*, **33**: 976-978.
- PRUETT, J.H.; BARRETT, C.C.; FISHER, W.F. (1987). Kinetic development of serum antibody to purified *Hypoderma lineatum* proteins in vaccinated and non-vaccinated cattle. *Southwest Entomology*, **12** (2): 79-88.
- PRUETT, J.H.; FISHER, W.F.; DELOACH, J.R. (1989). Dexamethasone-induced bovine T-lymphocyte suppression and the effect upon susceptibility to sheep scab mite (Acari: Psoroptidae) infestation. *Journal of Economic Entomology*, **82** (1): 175-179.
- PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B.; BURKETT, B.K. (1988). Antigenicity and immunogenicity of *Hypoderma lineatum* soluble proteins in the bovine host. *Veterinary Parasitology*, **29**: 53-63.
- QUINTERO-MARTÍNEZ, M.T.; NEGRETE, J.O.; BENÍTEZ, R.; MÉNDEZ, M.A.; JUÁREZ VEGA, G.; CRUZ-VÁZQUEZ, C. (2007). Presence of *Hypoderma lineatum* stage I larvae in the esophagus of cattle slaughtered in Chihuahua, Chih., Mexico. *Veterinary Parasitology*, **146** (1-2): 189-191.
- RAMACHANDRA, R.N.; WIKEL, S.K. (1995). Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. *Journal of Medical Entomology*, **32** (3): 338-345.

- REINA, D.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; MOLINA, J.M.; HERNANDEZ, S. (1994). Present status of warble fly in Extremadura (South-West of Spain). Editado por: PFISTER, K.; CHARBON, J.L.; TARRY, D.W.; PITHAN, K. En: *Improvements in Control Methods for Warble-fly in cattle and goats*. Comisión Europea, Thun: 59-64.
- ROBERTSON, R.H. (1980). Antibody production in cattle infected with *Hypoderma* spp. *Canadian Journal of Zoology*, **58**: 245-251.
- ROCCHI, M.S.; BALLINGALL, K.T.; MACHUGH, N.D.; MCKEEVER, D.J. (2006). The kinetics of *Theileria parva* infection and lymphocyte transformation in vitro. *International Journal for Parasitology*, **36** (7): 771-778.
- ROMANIUK, A. (1974). Neurochemical bases of defensive behavior in animals. *Acta of Experimental Neurobiology*, **34**: 205-214.
- ROMERO, J.A. (2010). *Estudio sobre técnicas inmunoenzimáticas para el diagnóstico de la oestrosis en pequeños rumiantes y análisis de su utilidad en encuestas seroepidemiológicas*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 148 pp.
- ROMERO, J.A.; ARIAS, M.S.; SUÁREZ, J.L.; PAZ-SILVA, A.; FRANCISCO, I.; ALONSO, F.; CORTIÑAS, F.J.; DACAL, V.; ROMASANTA, A.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; SCALA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2010). Application of the analysis of serum antibodies (immunoglobulins M and G) to estimate the seroprevalence of ovine oestrosis and to evaluate the effect of chemotherapy. *Journal of Medical Entomology*, **47** (3): 477-481.
- ROSENBERGER, G. (1994). *Exploración clínica de los bovinos*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 680 pp.

- ROZENFIELD, C.; MARTINEZ, R.; SEABRA, S.; SANT-ANNA, C.; GONÇALVES, J.G.R.; BOZZA, M.; MOURA-NETO, V.; DE SOUZA, W. (2005). *Toxoplasma gondii* prevents neuron degeneration by interferon-gamma activated microglia in a mechanism involving inhibition of inducible nitric-oxide, synthase and transforming growth factor B1 production by infected microglia. *American Journal of Pathology*, **167**: 1021-1031.
- RUITENBERG, E.J.; BUYS, J. (1976). An immunofluorescence technique for the detection of *Toxocara canis* antibodies. *Veterinary Parasitology*, **1**: 231-237.
- RUIZ, P. (1982). *Contribución al estudio de la hipodermosis en la provincia de Córdoba*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- SALMON, S.E.; CROWLEY, J.J.; GROGAN, T.M.; FINLEY, P.; PUGH, R.P.; BARLOGIE, B. (1994). Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alfa in the treatment of multiple myeloma: a Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, **12** (11): 2405-2414.
- SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. (1986). *Hematología Veterinaria*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 857 pp.
- SCHARFF, D.K. (1950). Cattle grubs, their biologies, their disribution and experiments in their control. *Technical Bulletin Montana State College, Agriculture Experimental Station*: 471.
- SCHARTON-KERSTEN, T.; AFONSO, L.C.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. (1995). IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology*, **154**: 5320-5330.
- SCHNITTGER, L.; HOLLMANN, C.; DIEMER, U.; BOGUSLAWSKI, K.; AHMED, J.S. (2000). Proliferation and cytokine profile of *T. annulata*-infected ovine, caprine, and bovine lymphoblastoid cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **916**: 676-680.

- SCHOLL, P.J. (1990). A review of parasites, pathogens, and predators of cattle grubs. *The Southwestern Entomology*, **15**: 360-365.
- SCHOLL, P.J.; BARRETT, C.C. (1986). Technique to extract *Hypoderma* sp. (Diptera:Oestridae) larvae from the backs of cattle. *Journal of Economic Entomology*, **79**: 1125-1126.
- SCHOLL, P.J.; WEINTRAUB, J. (1988). Gonotrophic development in *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae) with notes on reproductive capacity. *Annals of the Entomological Society of America*, **81**: 315-324.
- SCHOLL, P.J.; SCHWINGHAMMER, K.A.; CHAMBERLAIN, W.F. (1989). Technique for age-grading late third-instar *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **26** (3): 230-233.
- SCHWINGHAMMER, K.A.; PRUETT, J.H.; TEMEYER, K.B. (1988). Biochemical and immunological properties of HPLC peak 2 and ion exchange fraction of common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Journal of Economic Entomology*, **81**: 549-554.
- SENET, J.M.; DOBY, J.M.; DEUNFF, J.; LEYNIA DE LA JARRIGE, P. (1982). Intérêt de l'application de l'hémagglutination indirecte au diagnostic de l'hypodermose humaine, á la lumière de résultats obtenus en parallèle avec l'immuno-électrophorèse. *Médecine et Maladies infectieuses*, **12** (9): 486-491.
- SERGEANT, G. (1941). Sur le rôle pathogène possible des larves d'*Hypoderma bovis* au cours de leur migration chez les bovides. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire Française*, **94**: 103-107.
- SERRANO, J.M.; CÁMARA, S.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; MARTÍNEZ-MORENO, A. (1999). Evolución de los niveles séricos de IgM específica frente a productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* (FHESP) durante infecciones experimentales en cabras. *VI Congreso ibérico de Parasitología*: 132.

- SEVERINOVÁ, J.; SALÁT, J.; KROCOVÁ, Z.; REZNÍCKOVÁ, J.; DEMOVÁ, H.; HORKÁ, H.; KOPECKÝ, J. (2005). Co-inoculation of *Borrelia afzelii* with tick salivary gland extract influences distribution of immunocompetent cells in the skin and lymph nodes of mice. *Folia Microbiologica*, **50**: 457-463.
- SHER, A. (1992). Schistosomiasis. Parasitizing the cytokine system. *Nature*, **356** (6370): 565-566.
- SHER, A.; COFFMAN, R.L. (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology*, **10**: 385-409.
- SHU, D.; PFEFFER, A.; PERNTHANER, A. (2009). Cutaneous cytokine gene expression and cellular responses in lambs infested with the louse, *Bovicola ovis*, and following intradermal injection of crude louse antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **129** (1-2): 82-92.
- SIMMONS, S.W. (1937). Some histopathological changes caused by the larvae in the esophagus of cattle. *Journal of Parasitology*, **23**: 376-381.
- SINCLAIR, I.J.; WASSALL, D.A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Hypoderma bovis* in cattle. *Research in Veterinary Science*, **34**: 251.
- SINCLAIR, I.J.; TARRY, D.W.; WASSALL, D.A. (1984). Persistence of antibody in calves after an infection with *Hypoderma bovis*. *Research in Veterinary Science*, **37**: 383-384.
- SOLOPOV, N.V. (1988). Features of the ecology of juvenile forms of subcutaneous gadfly in reindeer. *Soviet Journal of Ecology*, **19** (5): 299-304. (Review of Medical and Veterinary Entomology, 1990).
- SOPP, P.; HOWARD, C.J. (2001). IFN gamma and IL-4 production by CD4, CD8 and WC1 gamma delta TCR(+) T cells from cattle lymph nodes and blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **81** (1-2): 85-96.

- SUÁREZ, J.L.; SCALA, A.; ROMERO, J.A.; PAZ-SILVA, A.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; DÍAZ, P.; MORRONGO, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R. (2005). Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology*, **134** (1-2): 153-158.
- SUK, K.; SOMERS, S.D.; ERICKSON, K.L. (1993). Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology*, **80** (4): 617-624.
- SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL GIUDICE, G.; AGUET, M.; LOUIS, J.A. (1995). Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *The Journal of Experimental Medicine*, **181**: 961-971.
- SWIST, S.L.; WILKERSON, M.J.; WYATT, C.R.; BROCE, A.B.; KANOST, M.R. (2002). Modulation of bovine lymphocyte response by salivary gland extracts of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **39** (6): 900-907.
- SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, **177**: 1797-1802.
- TALEGÓN, F. (1969). *Estudios sobre la hipodermosis bovina*. Ministerio de Agricultura. Madrid. 197 pp.
- TARLETON, R.L. (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *Journal of Immunology*, **140** (8): 2769-2773.
- TARRY, D.W. (1980). Warble fly infestation and climate. *The Veterinary Record*, **106**: 559-560.

- TARRY, D.W. (1981). Distribution of cattle warble flies in Britain. *The Veterinary Record*, **108**: 69-72.
- TEMEYER, K.B.; PRUETT, J.H. (1990). Preparation of biologically active messenger RNA from larvae of the common cattle grub (Diptera: Oestridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **83** (1): 55-58.
- THOUVENIN, M.; CANDOLFI, E.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; KIEN, T. (1997). Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are type 2 dependent. *Parassitología*, **39** (4): 279-283.
- TIZARD, I.R. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Ed. Elsevier España, Barcelona. 574 pp.
- TOLSON, D.L.; TURCO, S.J.; BEECROFT, R.P.; PEARSON, T.W. (1989). The immunochemical structure and surface arrangement of *Leishmania donovani* lipophosphoglycan determined using monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **35** (2): 109-118.
- TONG, N.T.; IMHOFF, J.M.; LECROISEY, A.; KEIL, B. (1981). Hypodermin A a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochemical and Biophysical Acta*, **658**: 209-219.
- TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BARERA, A.; DIELI, F.; SIRECI, G.; GENCHI, C.; DEPLAZES, P.; SALERNO, A. (2005). *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN- $\gamma$  production in pregnant dogs and their puppies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **108**: 247-251.
- VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F.; MACKELLAR, A.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.A.; MILLER, H.R. (2005). Characterisation of lesional infiltrates of dendritic cells and T cell subtypes during primary infestation of sheep with *Psoroptes ovis*, the sheep scab mite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **105** (1-2): 141-150.



- VAN DEN BROEK, A.H.; HUNTLEY, J.F.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.; BATES, P.; GROVES, B.; MILLER, H.R. (2000). Cutaneous and systemic responses during primary and challenge infestations of sheep with the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunology*, **22**: 407-414.
- VÁZQUEZ, L. (2005). *Validez del ELISA sándwich para el diagnóstico de campo de la hipodermosis bovina en Galicia*. Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 145 pp.
- WANG, Z.Q.; HAN, H.; CUI, J. (2005). Preliminary study on congenital transmission of *Trichinella spiralis* in mice. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **23** (3): 73-77.
- WATSON, D.L.; COLDITZ, I.G.; ANDREW, M.; GILL, H.S.; ALTMAN, K.G. (1994). Age-dependent immune response in Merino sheep. *Research in Veterinary Science*, **57**: 152-158.
- WEBSTER, K.A. (1998). Immunodiagnosis. Editado por: BOULARD, C.; O'BRIEN, D.; PITHAN, K.; SAMPIMON, O.; SOL, J.; WEBSTER, K. En: *Improvements in control methods for Warble-fly in farm livestock*. COST 811. Comisión Europea. Bruselas.
- WEBSTER, K.A.; GILES, M.; DAWSON, C. (1997a). A competitive ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. *Veterinary Parasitology*, **68** (1-2): 155-164.
- WEBSTER, K.A.; DAWSON, C.; FLOWERS, M.; RICHARDS, M.S. (1997b). Serological prevalence of *Hypoderma* species in cattle in Great Britain (1995/96) and the relative value of serological surveillance over clinical observation. *The Veterinary Record*, **141** (11): 261-263.
- WEI, Q.K.; LI, J.; FU, T.X.; BAI, X.L.; CUI, Y.; ZHANG, D.B.; WANG, H.F.; LIU, Y.B.; FU, B.; ZAI, D.F.; HUANG, B.C.; LIU, K.Y.; HAN, G.D. (2006). Studies on the immuno-protection of ROP2 nuclei acid vaccine in *Toxoplasma gondii* infection. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **24**: 337-341.

- WEINTRAUB, J. (1961). Inducing mating and oviposition of the warble flies *Hypoderma bovis* (L.) and *Hypoderma lineatum* (De Vill.) (Diptera: Oestridae) in captivity. *Canadian Entomology*, **93**: 149-156.
- WEINTRAUB, J.; MCGREGOR, W.S.; BRUNETT, H.M. (1961). Artificial infestation of the northern cattle grub *Hypoderma bovis* in Texas. *Journal of Economic Entomology*, **54**: 84.
- WEINTRAUB, J.; ROBERTSON, R.H.; GOODING, R.H. (1968). Experiments in hybridizing the warbles flies *Hypoderma lineatum* (De Vill.) and *Hypoderma bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Canadian Journal of Zoology*, **46**: 129-133.
- WIJNGAARD, P.L.; METZELAAR, M.J.; MACHUGH, N.D.; MORRISON, W.I.; CLEVERS, H.C. (1992). Molecular characterization of the WC1 antigen expressed specifically on bovine CD4-CD8- gamma delta T lymphocytes. *Journal of Immunology*, **149** (10): 3273-3277.
- WILSON, D.C.; MATTHEWS, S.; YAP, G.S. (2008). IL-12 signaling drives CD8+ T cell IFN-gamma production and differentiation of KLRG1+ effector subpopulations during *Toxoplasma gondii* Infection. *Journal of Immunology*, **180**: 5935-5945.
- WOLFE, L.S. (1959). Observations on the histopathological changes caused by the larvae of *Hypoderma bovis* (L.) and *Hypoderma lineatum* (de Vill.) (Diptera: Oestridae) in tissues of cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, **39**: 145-157.
- YAMOV, V.Z.; SOLOPOV, N.V.; RAABE, I.Y. (1990). *Hypoderma diana* (Hypodermatidae) from maral deer in the Altai. *Parazitologiya*, **24** (4): 289-295. (Review of Medical and Veterinary Entomology, 1991).
- ZHANG, W.Y.; MOREAU, E.; HOPE, J.C.; HOWARD, C.J.; HUANG, W.Y.; CHAUVIN, A. (2005). *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, **111**: 154-159.

ZINTL, A.; GRAY, J. S.; SKERRETT, H. E.; MULCAHY, G. (2005). Possible mechanism under lying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunology*, **27**: 115.

ZUMPT, F. (1965). *Myasis in man and animals in the old world*. Ed. Butterworths, Londres: 205-229.